



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y
BIOLÓGICAS “DR. IGNACIO CHÁVEZ”**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**EVALUACIÓN MOLECULAR DE DIVERSOS RECEPTORES Y ENZIMAS
PLACENTARIOS EN LA PREECLAMPSIA**

Tesis que presenta la

Méd. Cir. y P. *Obdulia Ruiz González*

para obtener el grado de

Maestría en Ciencias de la Salud

**Área terminal:
Ciencias Fisiológicas**

Directores de la tesis:

M.C. Víctor Manuel Farías Rodríguez
Facultad de C. M. y B.: “Dr. Ignacio Chávez”

D.C. Daniel Godínez Hernández
I.I.Q.B.

Morelia, Michoacán.

Julio de 2009.

**Durante la realización del presente trabajo se
contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia
y Tecnología con número de registro 23077 y de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de
Hidalgo.**

Tesis realizada bajo la dirección de:
M. C. Víctor Manuel Farías Rodríguez
D. C. Daniel Godínez Hernández

AGRADECIMIENTOS:

Imperecederos a mis directores de tesis, M. en C. y M. en E. M. Víctor Manuel Farías Rodríguez y D. en C. Daniel Godínez Hernández, por su inmensurable contribución en mi preparación; asimismo, por proporcionarme todas las facilidades para la realización del presente proyecto.

A mis sinodales, D. en C. Martha Eva Viveros Sandoval, M. en C. Juan Carlos Cortés García y D. en C. Alain Raymundo Rodríguez Orozco, por los valiosos comentarios que pulieron, de manera importante, el presente trabajo.

A todo el personal del Hospital General “Dr. Miguel Silva, especialmente al Dr. Alfonso Martínez García, jefe del Servicio de Ginecología y Obstetricia en ese entonces, y actual subdirector, por abrirnos generosamente las puertas del mismo, proporcionándonos todas las facilidades.

A la M. en F.B. Leticia Pérez Ordaz, a las pasantes de licenciatura en QFB: Denisse Mejía García y Alejandra Guzmán Valdés, por su colaboración en el trabajo experimental.

Al M. en C. Héctor Urquiza Marín, en ese momento director del IIQB, por todas las facilidades brindadas.

Al personal Académico, Administrativo y del área de la salud del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, de la Facultad de Medicina de nuestra Universidad y del Hospital General “Dr. Miguel Silva” que, directa o indirectamente, contribuyeron en el desarrollo de este proyecto.

DEDICATORIA

Para mi abuela, María de Jesús (Tita, para sus bisnietos), por el legado de bondad y buena educación, fortaleza y sabiduría de la vida que nos heredó.

Para mi abuelo Pedro, por haber sido ejemplo de entereza, decisión e integridad.

Para mis padres (Adolfo y Amalia), magnánimas raíces y pilares cotidianos, por la fe, ternura, amor incondicional y ejemplo de vida siempre presentes.

Para mis hermanos (Viola Irma, Pedro, Raquel, Abel Adolfo, Eduardo Germán, Ana María y José Luis), compañeros generosos, por el apoyo absoluto que me han brindado.

Para mis hijos (Alán Omar, Juventino, Olivia Esmeralda y Violeta Estefanía), motivación de mi existencia, por ser excelentes seres humanos y esforzarse por ser mejores.

Para todos ellos, con inmenso amor,

Olivia.

ÍNDICE GENERAL

Índice general.....	i
Índice de figuras.....	iv
Índice de tablas.....	v
Lista de abreviaturas.....	vi
Resumen.....	vii
Abstract.....	viii
I. ANTECEDENTES.....	1
1. EMBARAZO NORMAL.....	1
1.1. Adaptaciones fisiológicas en el embarazo normal.....	1
1.1.1. Alteraciones cardíacas y hemodinámicas.....	1
1.1.2. Cambios renales.....	2
1.1.3. Cambios endócrinos.....	3
1.2. La placenta.....	4
2. TRASTORNOS HIPERTENSIVOS DEL EMBARAZO.....	7
2.1. Definición de preclampsia.....	8
2.2. Clasificación de la hipertensión en el embarazo.....	8
2.2.1. Preeclampsia-eclampsia.....	9
2.3. Diagnóstico de preclampsia.....	11
2.4. Epidemiología.....	13
2.5. Síndrome de HELLP.....	14
2.6. Preeclampsia grave.....	16
3. LA PLACENTA EN LA PREECLAMPSIA.....	16
4. MECANISMOS INMUNOLÓGICOS EN LA PREECLAMPSIA.....	18
5. MEDIADORES VASOACTIVOS EN LA PREECLAMPSIA.....	19
5.1. El sistema renina angiotensina-aldosterona.....	19
5.2. El sistema nervioso simpático.....	20
5.3. Metabolitos del ácido araquidónico.....	22
5.4. La vía del óxido nítrico (NO) en la preclampsia.....	24
II. JUSTIFICACIÓN.....	26
III. HIPÓTESIS.....	27
IV. OBJETIVO GENERAL.....	27
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27

VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
1. Material biológico.....	28
2. Grupos experimentales.....	28
3. Criterios de inclusión, de exclusión y de no inclusión.....	28
A) Criterios de inclusión.....	28
B) Criterios de exclusión.....	29
C) Criterios de no inclusión.....	29
4. Transporte, disección vascular, conservación y eliminación de las placentas.....	29
5. Preparacion del tejido.....	30
6. Análisis de los receptores AT ₁ y AT ₂ ; B ₁ y B ₂ y de las enzimas NOS3, COX-1 y COX-2 por Western Blot.....	31
7. Manejo de los resultados.....	33
8. Análisis estadístico.....	33
VII. RESULTADOS.....	35
1. PARÁMETROS CLÍNICOS.....	35
1.1. Registro de la tensión arterial.....	35
1.2. Proteinuria y edema.....	35
1.3. Semanas de gestación.....	36
1.4. Peso y talla de los recién nacidos.....	37
2. DETERMINACIONES MOLECULARES.....	39
2.1. Niveles de las enzimas NOS3, COX-1 y COX-2 en vasos Placentarios.....	39
2.2. Niveles de los receptores a la angiotensina II (AT ₁ y AT ₂) y a la bradicinina (B ₁ y B ₂) en vasos placentarios.....	42
2.2.1. <i>Niveles proteicos de los receptores a la angiotensina II (AT₁ y AT₂).....</i>	42
2.2.2. <i>Niveles proteicos de los receptores a la Bradicinina (B₁ y B₂).....</i>	44
VIII. DISCUSIÓN	46
IX. CONCLUSIONES.....	53
X. PERSPECTIVAS.....	54
XI. REFERENCIAS.....	55

XI. ANEXOS.....	59
1. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.....	60
2. Ética del estudio.....	63
3. Ficha Clínica.....	64
4. Preparación de soluciones para Western Blot.....	65
4. Curva patrón con BSA.....	69
5. Gráfica de α -actina en embarazadas preeclámpticas y normotensas.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Tensión arterial en normotensas y preeclámpticas 33

1. Semanas de gestación en normotensas y preeclámpticas.....	34
2. Peso de los recién nacidos.....	35
3. Talla de los recién nacidos.....	35
4. Niveles proteicos de la NOS ₃	36
5. Niveles proteicos de la COX-1.....	37
6. Niveles proteicos de la COX-2.....	37
7. Niveles proteicos de los receptores AT ₁ y AT ₂	38
8. Niveles proteicos de los receptores B ₁ y B ₂	40

ÍNDICE DE TABLAS

1. Funciones de la placenta.....	5
2. Hipertensión en el embarazo	7
3. Pruebas de laboratorio para hipertensas embarazadas.....	10
4. Factores de riesgo para la preeclampsia.....	11

LISTA DE ABREVIATURAS

Ang I.....	Angiotensina I
Ang II.....	Angiotensina II
AT ₁	Receptor de la angiotensina II
AT ₂	Receptor de la angiotensina II
B ₁	Receptor de la bradicinina
B ₂	Receptor de la bradicinina
BSA.....	Albúmina sérica bovina
cm.....	Centímetro
COX-1.....	Ciclooxigenasa constitutiva del ácido araquidónico
COX-2.....	Ciclooxigenasa inducible del ácido araquidónico
cGMP.....	Monofosfato cíclico de guanosina
g.....	Gramo
DAG.....	Diacilglicerol
ECA.....	Enzima convertidora de angiotensina
HELLP.....	Acrónimo: h emolysis e levated liver enzyme and low platelet syndrome
IP ₃	Trifosfato de inositol
kDa.....	kilodalton
L-NAME.....	N ^G -nitro-L-arginina-metil-éster
NO.....	Óxido nítrico
NOS.....	Sintetasa o sintasa del óxido nítrico
eNOS ó NOS ₃	Sintasa de óxido nítrico endotelial
iNOS ó NOS ₂	Sintasa del óxido nítrico inducible
nNOS ó NOS ₁	Sintasa del óxido nítrico neuronal
PGI ₂	Prostaciclina o prostaglandina I ₂
PIH.....	Hipertensión inducida en el embarazo
PKC.....	Proteína cinasa C
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PLC.....	Fosfolipasa C
PLD.....	Fosfolipasa D
PVDF.....	Fluoruro de polivinildieno
RN.....	Recién nacido
RCIU.....	Restricción en el crecimiento intrauterino
SDG.....	Semanas de gestación
SDS-PAGE.....	Sodio dodecil sulfato- gel de poliacrilamida
SGA.....	Edad gestacional pequeña
SHR.....	Rata espontáneamente hipertensa
SNA.....	Sistema nervioso autónomo
SNS.....	Sistema nervioso simpático
SRAA.....	Sistema renina angiotensina aldosterona
TA.....	Tensión arterial
TAD.....	Tensión arterial diastólica
TAS.....	Tensión arterial sistólica
TXA ₂	Tromboxano A ₂
TXB ₂	Tromboxano B ₂
U.A.....	Unidades arbitrarias

RESUMEN

La preeclampsia es una patología hipertensiva del embarazo reportado desde hace más de 2000 años. De acuerdo a *la International Society for the Study of the Hypertension in Pregnancy*, es un síndrome caracterizado por la presencia de hipertensión y proteinuria, y es la principal causa de morbilidad y mortalidad materno-fetal en los países en desarrollo. La preeclampsia es un síndrome multisistémico caracterizado por vasoconstricción, cambios metabólicos, disfunción endotelial, activación de la cascada de la coagulación e incremento en la respuesta inflamatoria, por mencionar solamente algunos de los sistemas orgánicos involucrados.

Actualmente, se conoce que existe una disminución en la perfusión tisular útero-placentaria generada por la invasión superficial e insuficiente del citotrofoblasto sobre las arterias espirales uterinas, lo que impide su remodelación, conservando éstas su estructura histológica original y su capacidad de respuesta a los distintos moduladores endoteliales; como consecuencia, se producen hipoxia e isquemia placentarias. No obstante, el mecanismo fisiopatológico de la preeclampsia es aún desconocido.

El presente trabajo consistió en un estudio con 22 mujeres, en trabajo de parto, del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital General “Dr. Miguel Silva” de Morelia, Michoacán: 15 normotensas (controles) y 7 con preeclampsia, de quienes, obtuvimos sus placentas, por parto eutócico vaginal o por cesárea electiva, con el fin de evaluar molecularmente a diversos receptores y enzimas de vasos coriónicos placentarios. Determinamos los niveles proteicos de algunas enzimas y de receptores a ligandos vasoactivos en arterias placentarias de mujeres preeclámplicas y obtuvimos los siguientes hallazgos: una disminución en los niveles de ciclooxigenasa inducible (COX₂) y del receptor de angiotensina tipo 2 (AT₂), aumento en los niveles de la sintasa del óxido nítrico endotelial (NOS₃) y del receptor B₂ para bradicinina en arterias placentarias de mujeres preeclámplicas versus normotensas. Las pacientes con preeclampsia desarrollan autoanticuerpos contra el receptor AT₁ de angiotensina. Este hecho es consistente con nuestros resultados, puesto que ambos receptores de angiotensina disminuyeron en los vasos placentarios de pacientes preeclámplicas.

Los signos clínicos (aumento de la tensión arterial, proteinuria, disminución en el peso y la talla de los recién nacidos, etc.) de nuestra muestra corroboran el diagnóstico de preeclampsia.

En conclusión los niveles proteicos de enzimas y de los receptores en los vasos placentarios de pacientes preeclámplicas revelan la disfunción y el daño endotelial producido por esta enfermedad y las tentativas de ajuste homeostático fallido por parte de los moduladores endoteliales; nos abre, asimismo, la perspectiva de determinar de manera directa los niveles séricos del óxido nítrico y sus metabolitos (nitratos y nitritos), las prostaglandinas (especialmente la prostaciclina, PGI₂, y el tromboxano A₂), la angiotensina II, las catecolaminas (NA, A), la endotelina y de explorar la participación de las hormonas sexuales femeninas (estrógenos y progesterona) en la fisiopatología de la preeclampsia.

ABSTRACT

Preeclampsia is a hypertensive disorder of pregnancy reported by Celso 2000 years ago. According to the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP), preeclampsia is a maternal syndrome recognized by new-onset gestational hypertension and proteinuria and it's the major cause of maternal morbidity and mortality in developing countries.

There is evidence that placental hypoperfusion is generated by shallow trophoblastic invasion of uterine spirals arteries, which prevents their remodeling and preserve their original histological structure, and their responsiveness to the distinct endothelial modulators. Consequently, placental hypoxia and ischemia are produced. However, pathophysiology of preeclampsia still remains unknown.

We carried out a study with 22 pregnant women at term: 15 normotensive (controls) and 7 preeclamptic from whom we got their placentas (by vaginal or abdominal delivery). They were recruited from the Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital General "Dr. Miguel Silva" from Morelia, Michoacán, México. We determined molecularly several receptors and enzymes from placental corionic vessels and we found the following discoveries:

Clinical findings (hypertension, proteinuria, neonates weight and height reduction, etc.) from our sample corroborate preeclampsia diagnosis.

In preeclamptic group, inducible cicloxygenase (COX₂) and type 2 angiotensin receptor (AT₂) levels were reduced, and we got a rise in endothelial NO synthase (NOS3) level, and in bradikinin B₂ receptor. It has been demonstrated that patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT₁ receptor. This fact is consistent with our results, since both angiotensin II receptors were reduced in placental vessels from preeclamptic women.

We concluded that enzymes and receptors proteic levels from placental vessels in preeclampsia could be support, at least in part, both endothelial injury and dysfunction, and abnormalities in endothelial modulators production and/or release. Nevertheless, we have to determine serum levels of these substances, and to explore the participation of sexual hormones (estrogens and progesterone) in the pathophysiology of preeclampsia.

I. ANTECEDENTES

1. EMBARAZO NORMAL

1.1. Adaptaciones fisiológicas en el embarazo normal

1.1.1. Alteraciones cardíacas y hemodinámicas

El embarazo normal se caracteriza por una vasodilatación generalizada tan pronunciada que, pese al aumento del gasto cardíaco y del volumen plasmático en el rango del 40%⁵¹, la tensión arterial (TA) media disminuye aproximadamente 10 mmHg²⁵. La disminución de la TA se hace evidente en el primer trimestre y alcanza el nadir en la mitad del embarazo. A partir de entonces la TA aumenta en forma gradual y alcanza los valores previos al embarazo al término de éste; no obstante, puede aumentar de forma transitoria en el puerperio, hasta valores ligeramente por encima de los niveles previos al embarazo.

En el control de la presión arterial, durante el embarazo normal, participan diversos sistemas presores (nervioso autónomo y catecolaminas, renina-angiotensina, vasopresina), la función de los barorreceptores, la función de las células endoteliales y los cambios mediados por el volumen, los cuales se han evaluado ampliamente en animales y sólo en forma esporádica en mujeres embarazadas. Empero, los estudios en animales con frecuencia son contradictorios, en parte, debido a las diferencias entre las especies⁷.

No se han demostrado diferencias en la actividad nerviosa simpática en las mujeres embarazadas normotensas comparadas con las mujeres no

embarazadas. Sin embargo, el sistema renina-angiotensina se encuentra estimulado en forma significativa⁶⁴ y las mujeres embarazadas normotensas muestran una respuesta hipotensiva exagerada a la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina, en comparación con las mujeres no embarazadas, lo que sugiere que este sistema participa activamente en la TA normal⁵.

Por otro lado, en el embarazo existen ajustes cardíacos adicionales que ejercen un impacto sobre la TA, como el aumento en el gasto cardíaco y en el volumen sanguíneo⁴⁵. Se han reportado resultados variables con respecto a la importancia y el momento en que ocurren estos cambios, sugiriendo que el aumento del gasto cardíaco ocurre en forma temprana en el primer trimestre, en el segundo ocurre el aumento máximo²², se mantiene elevado durante el tercero, dependiendo de las variables individuales de cada paciente^{8, 14}.

Asimismo, el volumen plasmático y la masa de eritrocitos están aumentados en el embarazo normal, aunque la disminución de la TA asociada con la estimulación del sistema renina-angiotensina sugiere que el aumento del volumen es secundario a la vasodilatación y se percibe como normal. Hay, pues, aumento del gasto cardíaco y disminución de las resistencias periféricas.^{55, 57, 59}.

1.1.2. Cambios renales

Durante el embarazo normal ocurren alteraciones muy importantes en la hemodinámica renal que incluyen el aumento de, aproximadamente el 50%, en el

índice de filtrado glomerular y en el flujo sanguíneo renal³⁹, sin lograrse entender cabalmente la base de ellas.

Las embarazadas, normalmente, son hipercalciúricas, quizá debido al aumento del índice de filtrado glomerular de la dihidroxivitamina D₃ y de la hormona paratiroidea^{17, 20}.

1.1.3. Cambios endócrinos

Las adaptaciones endócrinas en el embarazo son los ajustes fisiológicos más significativos. El feto, la placenta, los ovarios y las glándulas suprarrenales participan en la producción de grandes cantidades de 17β-estradiol, estriol, progesterona, aldosterona, desoxicorticosterona, lactógeno placentario humano y gonadotropina coriónica humana, así como otras hormonas peptídicas específicas del embarazo y las prostaglandinas^{13, 16, 64}. A pesar del conocimiento profuso de la síntesis y el metabolismo de estas sustancias, su función precisa durante el embarazo normal se conoce poco. Tanto los estrógenos como la progesterona tienen efectos vasculares, renales y hemodinámicos; por lo tanto, es muy probable que interactúen con otros sistemas reguladores del control de la TA, durante el embarazo. Por ejemplo, los niveles elevados de estrógenos durante la gestación son, en parte, responsables del aumento en la renina. Igualmente, la progesterona es natriurética y aparentemente inhibe el efecto tubular renal de la aldosterona^{49,}

⁶⁴.

1.2. La placenta

La palabra placenta deriva del término *plakois* = torta, que se refiere a la forma de disco típica de la especie humana que, por extensión, se ha generalizado a todas las especies de placentas morfológicamente muy diferentes. Desde el punto de vista léxico –*plac* y *placent*- funcionan como elementos compositivos en diversas terminologías: con el significado el primero de placa, tableta, y el segundo con el de torta o pastel ligeramente abombado.

En los animales superiores, el útero representa un órgano –recipiente nutricional- dispuesto para la recepción, alojamiento, alimentación y protección del producto de la gestación hasta alcanzar el grado de madurez adecuado, en cuyo momento motiva la expulsión (parto)⁴².

En los *Eutheria*, o mamíferos superiores, la placenta se desarrolla en toda su plenitud, permitiendo que el embrión se desarrolle en el interior de la madre, que lo expulsa en un estado suficientemente desarrollado como para resistir al medio ambiente. A esta condición se le conoce como viviparidad.

A estas múltiples funciones, hay que añadir el que seguramente la placenta es el órgano que facilita la inmunotolerancia a la gestación. Incluso, el trofoblasto vierte en la sangre materna un gran número de proteínas.

La placenta humana es hemocorial y esto significa que la penetración del trofoblasto en las arterias espirales uterinas es muy precoz y muy profunda y, en pocos días después de la implantación, las células del trofoblasto no sólo corroen el epitelio y el tejido conjuntivo endometrial, sino que destruyen los vasos

maternos y las vellosidades coriales y por lo tanto se bañan directamente en la sangre materna. Esta disposición supone una agresión mayor y, es clara, una fuerte tendencia al rechazo. La placenta en los *Eutheria* tiene, pues, sistemas de inmunosupresión mucho más completos y sofisticados que la de los animales inferiores. A lo largo de la gestación, la placenta humana evoluciona de placenta hemocorial a placenta hemoendotelial y, por tanto, sólo tiene un endotelio entre la sangre fetal y la materna, las cuales están además muy próximas, lo que facilita la transferencia de sustancias por difusión.

La superficie placentaria está formada por plegamientos llamados vellosidades que aumentan su superficie de filtración, la cual corresponde a 3.71 m² por kg de peso fetal (13 metros para un feto de 3.5 kg); esta superficie es enorme comparada con el área pulmonar del adulto. Para un sujeto de 70 kg es de 90 metros cuadrados, es decir 1.28 m² por kg de peso.

Se ha desarrollado la teoría de que la placenta está compuesta por una serie de unidades, de las cuales trabajan en reposo sólo una tercera parte, algo semejante a lo que sucede con la nefrona en el riñón, se podría hablar así de una unidad “placentona” que estaría constituida básicamente por los cotiledones. Éstos están formados por una vellosidad primaria y un árbol de vellosidades secundarias y terciarias. Cuando todas las unidades placentarias funcionan, la placenta se expande y adquiere un volumen mayor, demostrable por la ecografía. La estructura vascular de la placentona está coordinada desde el lado materno y el

fetal y, de este modo, la sangre que llega a la placenta por la arteria espiral es correspondiente a la que llega al feto por el eje vascular de un cotiledón.

Se han demostrado aspectos funcionales placentarios muy importantes: uno de ellos es la existencia de un sistema microvillositario, donde hay abundantes muestras de pinocitosis, que es la forma más común de transferencia de grandes moléculas. Otro hallazgo de la ultraestructura placentaria ha sido la demostración de una capa basal *vasculosincitial*, colocada por debajo del sincitio, entre éste y el capilar fetal y semeja a la membrana basal del glomérulo. Esta membrana, al engrosarse, bloquea la filtración placentaria y da lugar a cuadros de insuficiencia en placentas patológicas que se encuentran sobre todo en la diabetes y en la preeclampsia-eclampsia.

La placenta crea en el útero un espacio inmunológico privilegiado, puesto que, se considera a la gestación como un aloinjerto el cual sería rechazado de no mediar una serie de mecanismos inmunoprotectores aún no conocidos del todo¹².

La placentación es un fenómeno posterior a la implantación. Se trata del establecimiento de relaciones definitivas y cada vez más perfectas al servicio de la nutrición del feto. El parto –madurez fetal- pone fin a la vida placentaria, que es expulsada tras el parto fetal (alumbramiento).

2. TRASTORNOS HIPERTENSIVOS DEL EMBARAZO

La hipertensión es una de las complicaciones médicas más comunes del embarazo y afecta por igual la salud materna y la del feto, a veces con consecuencias que amenazan la vida³⁶. Los trastornos hipertensivos son causas importantes de parto prematuro, restricción del crecimiento y muerte fetal intrauterinos. Las complicaciones maternas incluyen las que se atribuyen a un aumento excesivo de la presión sanguínea, como el accidente cerebrovascular isquémico, las insuficiencias cardíaca y renal agudas. Los trastornos hipertensivos en el embarazo continúan siendo una de las causas más importantes de muerte materna (15 al 20% de las muertes maternas en todo el mundo³⁸).

Tabla 1. Funciones de la placenta. Botella Llusía J, La placenta. Fisiología y Patología. Real Academia Nacional de Medicina 1992 pág 2. Madrid, España.

Función	Análoga a la del	Ejemplo
Respiratoria	Pulmón	Toma O ₂ de la sangre materna y devuelve CO ₂
Absorción	Intestino	Absorbe nutrientes de la sangre materna.
Excreción	Riñón	Elimina agua, electrolitos, urea y catabolitos.
Metabolismo	Hígado	Almacena glucógeno, sintetiza proteínas, almacena sustancias. Hígado transitorio fetal.
Endócrina	Varias glándulas	Forma diversidad de hormonas.
Inmunotolerancia a la gestación:		Hace que el aloinjerto que es el feto, no sea rechazado.

2.1. Definición de preeclampsia

La preeclampsia es un trastorno hipertensivo del embarazo que se caracteriza por la presencia de hipertensión, proteinuria y edema. La ***International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy*** reportó que la preeclampsia es la principal causa de morbilidad y mortalidad maternas en los países en desarrollo. Además, esta patología es la principal causa de prematuridad iatrogénica o de prematuridad extrema (menores de 33 semanas) cuando las condiciones fetales o maternas son de alto riesgo y cuando el inicio de la preeclampsia temprana severa se asocia con restricción del crecimiento intrauterino²².

2.2. Clasificación de la hipertensión en el embarazo

En la actualidad, se reconocen cuatro categorías de hipertensión en el embarazo, de acuerdo con el Consenso Nacional e Internacional (Prevención, diagnóstico y manejo de la preeclampsia/eclampsia, lineamiento técnico. Secretaría de Salud⁴⁶, OMS), las cuales se incluyen en la tabla 2.

Es sumamente importante realizar el diagnóstico preciso de la hipertensión en el embarazo debido a que la preeclampsia se asocia con una evolución adversa de la madre y del feto si ésta no se reconoce en forma precoz. Una intervención terapéutica crítica, como la elección del momento oportuno del parto, a menudo, se basa en la impresión clínica de la severidad hipertensiva y del estado de salud del producto de la concepción; por lo tanto, el diagnóstico

apropiado puede tener implicaciones significativas para la salud futura del feto y de la madre.

Tabla 2. Clasificación de la hipertensión en el embarazo. Modificado de Hughes EC (Ed): Obstetrics-Gynecologic Terminology. Philadelphia, FA Davis, 1972 p 422-423.

Entidad patológica	Características
Preeclampsia-eclampsia	Alteración multisistémica que por lo general se presenta en la segunda mitad del embarazo, se caracteriza por hipertensión, proteinuria, trombocitopenia, disfunción renal leve y en ocasiones alteraciones de las pruebas de funcionamiento hepático.
Hipertensión crónica	Hipertensión que precede al embarazo y que puede deberse a hipertensión esencial o cualquier forma de hipertensión secundaria (p. ej., enfermedad renal, hipertensión renovascular, feocromocitoma, hiperaldosteronismo).
Hipertensión crónica con preeclampsia sobreagregada	Desarrollo de hipertensión que empeora, proteinuria de comienzo reciente, hiperuricemia o trombocitopenia en la segunda mitad del embarazo en una mujer con hipertensión crónica.
Hipertensión transitoria	Elevación de la presión arterial al final del embarazo sin otros hallazgos de laboratorio de preeclampsia. Esta alteración puede recurrir con los embarazos posteriores y puede predecir el desarrollo futuro de hipertensión esencial.

2.2.1. Preeclampsia-eclampsia

Es un trastorno hipertensivo único del embarazo con participación renal consistente, que afecta tanto a la madre como al feto. Se acepta el concepto que, en la preeclampsia, la activación del sistema renina-angiotensina ocurre con la entrada de angiotensina II a la circulación sistémica y puede mediar la patogenia de dicha enfermedad (Escudero C, 2008), produciendo malaadaptación vascular,

con incremento en el tono vasomotor y disfunción vascular e incremento a la sensibilidad a la Ang II y a la noradrenalina en la preeclampsia manifiesta debido a mecanismos mediados por angiotensina II.

Recientemente, se han descrito mecanismos moleculares nuevos relacionados con la Ang II en la preeclampsia. Estos incluyen la heterodimerización de los receptores AT₁ de la Ang II y B₂ de la bradicinina y la producción de un autoanticuerpo agonístico contra el receptor AT₁ de la angiotensina II.

Se han propuesto varios mecanismos fisiopatológicos en el desarrollo de la preeclampsia. Estos incluyen la disfunción endotelial, una vía inflamatoria, el estrés oxidativo, la activación de la trombosis y el sistema renina angiotensina³².

La deficiente perfusión útero-placentaria es una característica común en todos los casos de preeclampsia y se considera que el SRA puede ser uno de los mecanismos responsables de esta deficiencia.

Asimismo, existen reportes de que la preeclampsia se desarrolla como consecuencia de alteraciones en los vasos que irrigan a la placenta¹⁹. Estas alteraciones en la circulación placentaria probablemente ocurren al inicio del segundo trimestre, mientras que las manifestaciones maternas de la enfermedad no se hacen evidentes hasta mucho más tarde en el embarazo, por lo general cerca del término. Los signos clínicos maternos más y mejor conocidos son la hipertensión, la proteinuria y el edema⁴⁶. Otras manifestaciones incluyen

alteraciones de la coagulación, en particular la trombocitopenia y la disfunción hepática.

2.3. Diagnóstico de preeclampsia

El criterio diagnóstico para la preeclampsia incluye los signos clínicos clásicos, que son: hipertensión con proteinuria, edema o ambos. Se considera proteinuria cuando hay una excreción urinaria proteica de 0.2 g o más en una muestra de 24 horas, o mayor que 1+ (una cruz) en una muestra de orina tomada al azar. Por otro lado, con frecuencia el edema acompaña a una gestación normal, por lo tanto, su presencia sola no es útil para el diagnóstico de preeclampsia, mientras que su ausencia no lo descarta; no obstante, en la preeclampsia, casi siempre se observa edema de manos y cara. Las pruebas de laboratorio con utilidad diagnóstica en la preeclampsia se muestran en la tabla 2.

La preeclampsia se manifiesta a la vigésima semana de la gestación, por lo general en primíparas y el diagnóstico se realiza con mayor facilidad cuando las mujeres tienen historia de normotensión bien documentada al inicio del embarazo. Los criterios para el diagnóstico de hipertensión incluyen un aumento de la TA sistólica de 30 mmHg o más; o cuando la TA diastólica (Korotkoff V) aumenta 15 mmHg o más sobre los valores previos (un promedio de los valores antes de la semana 20^a de la gestación^{47, 48}). Si la TA previa no se conoce, las lecturas superiores o iguales a 140/90 mmHg, se consideran lo suficientemente elevadas para satisfacer los criterios de hipertensión en esta patología¹⁹.

En muchas ocasiones, no se realiza un diagnóstico temprano de preeclampsia debido a que muchas mujeres jóvenes tienen registros de TA tan bajos como 90/60 mmHg a mediados del embarazo y, por lo tanto, un aumento de la misma puede enmascarse, confundirse y no reconocerse, puesto que, se detectan valores, aparentemente, normales.

Tabla 3. Pruebas estándares de laboratorio para las mujeres que desarrollan hipertensión luego de la mitad del embarazo (Tomada de Burrow-Duffy).

Análisis	Finalidad
Hemoglobina y hematocrito	La hemoconcentración apoya el diagnóstico de preeclampsia, indicador de severidad.
Frotis de sangre	Valores disminuidos en hemólisis signos de anemia hemolítica microangiopática (esquistocitos), diagnóstico de preeclampsia, aunque haya TA aumentada levemente.
Plaquetas	Niveles disminuidos sugieren preeclampsia severa.
Análisis de orina	Tira reactiva con 1+ o más, medición cuantitativa de excreción proteica.
Creatininemia	Embarazada hipertensa con proteinuria se diagnostica como preeclampsia hasta demostrar lo contrario.
Uricemia	Incrementos leves en la mayoría. Los niveles en aumento sugieren preeclampsia severa, en especial con oliguria.
Transaminasa oxalacética	Los niveles aumentados ayudan al diagnóstico diferencial y sugieren preeclampsia severa y compromiso hepático.
Deshidrogenasa del ácido láctico	Un aumento junto con hemólisis y daño hepático sugieren preeclampsia severa.
Albúmina sérica	Una disminución, aún en ausencia de proteinuria pronunciada, puede indicar “pérdida de capilares” o compromiso hepático.

Otras pruebas predictivas para la evaluación de la preeclampsia son, en muchas ocasiones, potencialmente útiles, como la excreción de calcio urinario¹⁸, la excreción de calicreína^{38, 57}, los niveles de fibronectina plasmática, los niveles de antitrombina III^{13, 14, 19} y el monitoreo de la TA ambulatoria^{20, 46}. Sin embargo, uno de los problemas más importantes, y que influye directamente en el desarrollo de la preeclampsia, es que las mujeres que presentan esta patología no siempre llevan un control prenatal y acuden al médico y/o al servicio de urgencias cuando ya presentan la sintomatología o por complicaciones.

2.4. Epidemiología

La preeclampsia es más común en las mujeres nulíparas, la incidencia en estas mujeres varía del 2 al 10% en las diferentes poblaciones^{15, 16, 17, 39}. Otros factores de riesgo, además de la nuliparidad, incluyen los antecedentes familiares positivos, las gestaciones múltiples, la presencia de hipertensión crónica subyacente, la enfermedad renal, la diabetes, la enfermedad hidatidiforme, los extremos de la edad reproductiva y el antecedente de preeclampsia en el segundo o el tercer trimestre en un embarazo previo (tabla 4)²⁴. El diagnóstico se realiza con mayor facilidad cuando las mujeres no tienen antecedentes de hipertensión y al momento de la medición presentan proteinuria, edema o ambos. La enfermedad ocurre y se diagnostica, por lo general, después de transcurrir las primeras 20 semanas de la gestación o con certeza al inicio de la misma cuando acontecen los datos necesarios para hacerlo.

La preeclampsia se caracteriza por la naturaleza impredecible de su evolución clínica. Las mujeres con TA levemente elevada y aún mínima proteinuria pueden progresar en forma rápida a la eclampsia, la forma convulsiva de la enfermedad, por lo tanto, todos los casos se deberían considerar potencialmente peligrosos. Sin embargo, ciertos signos son ominosos como, particularmente, una TA sistólica de 160 mmHg o más, o una TA diastólica de 110 mmHg o más, la proteinuria en rango nefrótico, la azoemia significativa (creatinina sérica > 1.2 mg/dl), el recuento de plaquetas menor de 100 000/mm³ o la evidencia de anemia hemolítica microangiopática, enzimas hepáticas elevadas, cefaleas u otras alteraciones cerebrales o visuales, el dolor epigástrico y el edema pulmonar⁶¹.

Tabla 4. Factores de riesgo asociados con la preeclampsia. Tomado de Burrows-Tuffy. Phyllis August

FACTORES DE RIESGO PARA LA PREECLAMPSIA

Nuliparidad

Antecedentes familiares positivos

Gestaciones múltiples

Hipertensión crónica

Enfermedad renal

Diabetes

Obesidad

Mola hidatiforme

Antecedentes de preeclampsia temprana (segundo trimestre) en el primer embarazo

2.5. Síndrome de HELLP

La forma clásica de preeclampsia posee una variante que se denominó síndrome HELLP^{31, 49, 61}. Este acrónimo se refiere a las alteraciones de laboratorio

específicas que caracterizan a la preeclampsia: **hemólisis**, pruebas de funcionamiento hepático elevadas (**liver**), recuento bajo (**low**) de **plaquetas**. Este síndrome se asocia con un pronóstico materno y fetal particularmente adverso^{111, 112}.

La mayoría de los obstetras consideran que el síndrome HELLP es una indicación de parto urgente, debido a que las alteraciones de laboratorio pueden alcanzar niveles que amenazan y pueden ser incompatibles con la vida, como la trombocitopenia muy severa y niveles extremadamente elevados de enzimas hepáticas. Una complicación rara de la preeclampsia es la ruptura hepática, en la que ocurre sangrado hepático subcapsular, quizás precedido por el síndrome HELLP. El síndrome de HELLP puede presentar severo daño o disfunción generalizada de las células endoteliales maternas, en comparación con otros casos de preeclampsia. Adicionalmente, los aspectos clínicos del síndrome HELLP son muy similares y a veces difíciles de distinguir de los que se presentan en otros síndromes microangiopáticos que se pueden desarrollar en las etapas finales del embarazo, como el síndrome urémico-hemolítico y la púrpura trombocitopénica trombótica. Estas alteraciones se caracterizan por daño de las células del endotelio vascular provocado por antígenos o sustancias tóxicas desconocidas. La distinción entre estas enfermedades y el síndrome HELLP es importante debido a que el tratamiento de éste es el parto urgente, mientras que el tratamiento del síndrome urémico-hemolítico o la púrpura trombocitopénica trombótica puede requerir transfusión de plasma o plasmaféresis⁵⁷.

2.6. Preeclampsia grave

La preeclampsia grave se caracteriza por un cuadro potencialmente mortal que puede progresar de forma brusca hacia un deterioro de la madre y del feto. Los criterios diagnósticos son los siguientes:

- PAS = 170 mmHg o PAD = 110 mmHg en 2 tomas separadas por un espacio de 6h.
- Proteinuria = 2 g/24 h.
- Creatinina = 1.2 mg/dL.
- Plaquetas < 100 000/mm³.
- Oliguria < 400 mL/24 h.
- Trastornos visuales o neurológicos.
- Edema pulmonar o cianosis.

3. LA PLACENTA EN LA PREECLAMPSIA

La placenta se considera de importancia central en la patogenia en la preeclampsia. Esto se debe a que el parto es la cura más exitosa de la enfermedad, si no la única definitiva. Además, es más probable que la preeclampsia ocurra en mujeres con molas hidatiformes (enfermedad trofoblástica caracterizada por un crecimiento rápido de la placenta pero no del feto) y en aquéllas con gestaciones múltiples (aumento de la masa placentaria)⁵⁸.

La placentación normal parece involucrar la transformación de las ramas de las arterias uterinas maternas, las arterias espirales, de arterias musculares de

paredes gruesas a vasos flácidos que permiten el paso de volúmenes mayores de sangre a la unidad útero-placentaria. Esta transformación involucra la invasión de las paredes de las arterias espirales por trofoblastos endovasculares que migran primero a la decidua y luego a todas las capas de la pared el vaso.

En las mujeres destinadas a desarrollar preeclampsia, la invasión trofoblástica de las arterias espirales es incompleta, esto puede ocurrir en la decidua pero no en el músculo liso arterial y en algunos vasos el proceso no ocurre en absoluto. Por lo tanto, las arterias persisten con paredes gruesas y musculares y los diámetros de los segmentos miométricos son la mitad de lo que miden en el embarazo normal. Se ha reportado que en la preeclampsia, el citotrofoblasto invasor no puede expresar, en forma apropiada, los receptores de adhesión que son necesarios para el remodelado normal de las arterias espirales maternas. Se considera que esta dificultad en la invasión trofoblástica es la base morfológica de la hipoperfusión placentaria en la preeclampsia ^{5, 9, 30}.

Se reportó la presencia de *aterosis aguda* en la preeclampsia, lesión de las arterias espirales uterinas que consiste en la acumulación de macrófagos cargados de grasas e infiltrados de células perinucleares. Se cree que esta lesión ocurre sólo en aquellas arterias que no fueron invadidas por células del trofoblasto y se han correlacionado las lesiones placentarias con la severidad de la enfermedad clínica ^{47, 48}.

La preeclampsia se ha asociado con un grado mayor de infartos placentarios que el que ocurre en la gestación normal. Sin embargo, la placenta

tiene reserva fisiológica considerable que compensa esa necrosis tisular, lo cual explica por qué algunas pacientes experimentan la pérdida del feto o la restricción del crecimiento y muerte fetal, mientras que la mayoría de ellas tienen recién nacidos con pesos normales para su edad gestacional; no obstante, la preeclampsia se asocia con un aumento de la incidencia de restricción del crecimiento intrauterino y muerte fetal.

4. MECANISMOS INMUNOLÓGICOS EN LA PREECLAMPSIA

La relación entre la enfermedad placentaria y la materna involucra la naturaleza de la respuesta inmune en la interfase materno-placentaria y la manera como esta respuesta podría conducir a la preeclampsia. Hay varios aspectos únicos de la respuesta inmune en el embarazo que parecen tener un papel en el desarrollo placentario normal: las células del trofoblasto no expresan los antígenos HLA clásicos; en su lugar expresan un antígeno no clásico, HLA-G, con posible función protectora de la placenta contra los efectos deletéreos de una respuesta inmune materna local⁵⁸. Por el contrario, se sugiere que el tejido placentario de los embarazos preeclámpticos expresan menos HLA-G, o en forma diferente y se postula que esto puede dar por resultado la eliminación de la tolerancia materna a la placenta inmunológicamente extraña^{15, 24}. También se ha reportado el aumento de los niveles de citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α y la interleucina-2 en el tejido placentario y en el suero de las mujeres

preeclámpticas^{15, 17, 63}. Estos factores podrían estar involucrados en la iniciación de una enfermedad sistémica mediada por mecanismos inmunes en la madre.

La observación de que la preeclampsia ocurre en forma primaria en las mujeres nulíparas, y en las gestaciones posteriores las posibilidades de complicaciones disminuyen a menos que exista un cambio en la paternidad, es un elemento que se consideró a favor de las alteraciones en la respuesta inmune como un factor en la patogenia de la preeclampsia⁷. Los informes epidemiológicos indican que la prevalencia de la preeclampsia disminuye en las mujeres que recibieron transfusiones de sangre heteróloga, practicaron el sexo oral o tuvieron un período prolongado de cohabitación que precedió al inicio de un embarazo, lo que sugiere que la exposición previa a los antígenos paternos podría ser protectora¹¹⁷). También se observó que ciertos cambios anatomopatológicos en la vasculatura placentaria se asemejan a los rechazos de aloinjertos. Además apoyando lo anterior, se reportó que, en la preeclampsia hay aumento de células T (células natural killer) y la activación de los neutrófilos (Taylor RN, 1997).

5. MEDIADORES VASOACTIVOS EN LA PREECLAMPSIA

5.1. El sistema renina angiotensina-aldosterona

En contraste con el embarazo normal, durante la preeclampsia, la actividad de la renina plasmática, la concentración sérica y la excreción urinaria de aldosterona y los niveles de angiotensina II disminuyen, aunque con frecuencia no a los niveles previos al embarazo. Existen evidencias que muestran una

estimulación del sistema renina-angiotensina en las mujeres que posteriormente desarrollan preeclampsia, en estadios tempranos del embarazo, y que la vasoconstricción que se desarrolla y la hipertensión “apagan” la secreción de renina. A medida que los niveles de renina disminuyen, la sensibilidad a la angiotensina II aumenta y con frecuencia esto ocurre con antelación a la aparición de los signos clínicos de la preeclampsia²⁶. Gant reportó en 1973 que, durante el embarazo normal, se requiere mayor concentración de angiotensina II para producir el efecto vasoconstrictor de la misma. A este efecto se le conoce como refractariedad a la angiotensina II, por parte de sus receptores. La pérdida de la refractariedad a la angiotensina II, durante el embarazo, se utilizó como prueba de control para identificar a las pacientes, en la etapa media del embarazo, con riesgo potencial de desarrollar la preeclampsia. Se ha reportado un aumento en la densidad de los receptores de angiotensina II en las plaquetas de las mujeres preeclámpticas comparados con los presentes en embarazadas normotensas.

5.2. El sistema nervioso simpático y los receptores adrenérgicos α_1

El incremento en los requerimientos nutricionales fetoplacentarios va seguido de un incremento en el gasto cardíaco y la volemia asociados con una reducción de las resistencias vasculares periféricas, eventos que redundan en el mantenimiento o, incluso, en un leve descenso de la TA media⁹. Sin embargo, no se han esclarecido totalmente los mecanismos responsables de estos cambios.

En el embarazo normal, se ha observado una disminución paradójica de la respuesta vasoconstrictora y presora a la angiotensina II y a los agonistas adrenérgicos en la presencia de un aumento de los niveles circulantes de renina y angiotensina II en este período. Por otro lado, la regulación adrenérgica es un mecanismo importante de control en el flujo sanguíneo uterino y en la oxigenación fetal; así que el embarazo se ha relacionado con cambios en los receptores adrenérgicos α y β con resultados controvertidos para la noradrenalina (NA) y para la adrenalina (A), tanto en ratas como en mujeres gestantes y no gestantes^{12, 37}.

La mayoría de los estudios en vasos sanguíneos de animales preñados han reportado una respuesta adrenérgica disminuida^{10, 11, 62}; sin embargo, algunos autores han reportado que no ocurrieron modificaciones o que hubo incremento de las respuestas adrenérgicas durante el embarazo^{27, 29}.

Las catecolaminas interactúan con la familia de receptores adrenérgicos presentes en la superficie de la membrana celular. Estos receptores están presentes en casi todos los lechos vasculares; de hecho, el mRNA para todos los tres subtipos de receptores adrenérgicos se ha encontrado en varios tipos arteriales de la rata^{44, 53}. Los estudios de unión con radioligandos, la inmunodetección con anticuerpos específicos y los estudios funcionales destacan que el receptor adrenérgico α_{1D} predomina en la contracción del músculo liso vascular^{28, 43, 44}. De hecho, estos receptores adrenérgicos se expresan funcionalmente en las arterias aorta, carótida, mesentérica, ilíaca, femoral y

renales, mediando la contracción de agentes adrenérgicos y contribuyendo al control de la tensión arterial en vivo^{30, 53, 62}.

Como se mencionó anteriormente, durante el embarazo normal la respuesta presora a los agonistas vasoconstrictores parece reducirse^{17, 22, 26, 37}. De igual manera, se reduce la reactividad vascular a los agonistas vasoconstrictores como el adrenérgico α_1 , fenilefrina (Phe), y la ANG II en ratas preñadas comparadas con ratas no preñadas. En contraste, la preeclampsia se caracteriza por vasoconstricción generalizada y por el incremento de la respuesta presora a los agonistas vasoconstrictores como los agonistas adrenérgicos.

Por otra parte, se han reportado concentraciones sanguíneas venosas altas de noradrenalina en mujeres que cursan con preeclampsia^{35, 52}. No obstante, existe escasa información acerca de cambios en los niveles de los receptores adrenérgicos en esta patología. La reactividad vascular incrementada a los vasoconstrictores, durante la preeclampsia, podría deberse al decremento de los mecanismos de relajación vascular y/o a mecanismos potenciadores de contracción del músculo liso vascular dependientes de endotelio.

5.3. Metabolitos del ácido araquidónico

En el embarazo con preeclampsia ocurren alteraciones en el metabolismo de los eicosanoides de mayor intensidad que en el embarazo normal. Se ha sugerido que las alteraciones del metabolismo de las prostaglandinas son el mecanismo base de la patogenia de la preeclampsia^{23, 63}. Se ha propuesto que las manifestaciones como el aumento de la reactividad vascular y de la TA arterial,

así como la coagulación intravascular se deben a un desequilibrio entre la síntesis de prostaciclina (PGI_2) y tromboxano (TXA_2), cuyo resultado es la deficiencia relativa o absoluta de PGI_2 ⁶³. Se ha reportado, una disminución en la producción de PGI_2 en varios tejidos (el tejido placentario, los vasos umbilicales, la orina y el líquido amniótico) y líquidos corporales de mujeres preeclámpticas, en comparación con mujeres normotensas tomadas como controles.

Por otra parte, la excreción urinaria de metabolitos TXB_2 como marcadores de la síntesis de TXA_2 es significativamente mayor en la preeclampsia que en mujeres embarazadas normotensas^{23, 24, 63}. Esta excreción aumentada de metabolitos en las pacientes preeclámpticas se correlaciona con los cambios en la presión arterial media y con la cuenta de plaquetas, los cuales son índices de la severidad de la preeclampsia; igualmente, otro indicador de la misma es la excreción de metabolitos TXB_2 ²³.

Así pues, el aumento en la síntesis de TXA_2 parece correlacionarse con la severidad de la preeclampsia y puede tener un papel patogénico en la enfermedad. Estos hallazgos han fundamentado el uso racional de la aspirina en el tratamiento y prevención de la preeclampsia²³. Algunos estudios clínicos sugieren que la aspirina a dosis bajas puede atenuar el desarrollo de la preeclampsia en mujeres con riesgo de padecerla¹⁸. Sin embargo, otros ensayos aleatorizados controlados con placebo, en mujeres con riesgo de preeclampsia, mostraron que la aspirina a dosis bajas puede carecer de beneficios o tenerlos de

pequeños a moderados cuando se usa en la prevención de esta enfermedad y con ésto se cuestiona la validez de dicha práctica⁶.

5.4. La vía del óxido nítrico (NO) en la preeclampsia

Los cambios vasculares durante la gestación normal se han atribuido, en parte, al incremento en la síntesis de NO por varias células maternas incluyendo las células endoteliales de los vasos^{3, 8, 18, 37}. Esto se apoya por reportes donde la expresión y actividad de la NO sintasa aumenta en las arterias uterinas humanas durante el embarazo. De igual manera, los niveles plasmáticos, la producción metabólica y la excreción urinaria de cGMP, un segundo mensajero de NO, que produce relajación del músculo liso vascular, aumentan durante el embarazo¹⁸. De manera interesante, la producción de cGMP se incrementa notablemente durante el primer trimestre cuando la circulación materna está vasodilatando rápidamente, mientras que la producción corporal total de NO, estimada por el nivel plasmático y la excreción urinaria de nitritos/nitratos no se eleva proporcionalmente, lo cual sugiere fuentes adicionales de cGMP⁸. Lo anterior ha llevado a proponer que una reducción en la producción de NO podría ser la causa del incremento en la resistencia vascular y de la TA durante la preeclampsia. En apoyo a esta hipótesis, se han reportado alteraciones en la producción de NO en mujeres con preeclampsia⁵⁰. Asimismo, el bloqueo de las NO sintasas con N^G-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME), durante la gestación media o tardía, en la rata produce cambios patológicos, similares a aquellos observados en mujeres con

preeclampsia como vasoconstricción renal severa, proteinuria, trombocitopenia y restricción en el crecimiento intrauterino^{8, 30}. Además, algunos estudios han mostrado que la TA se incrementa significativamente en ratas gestantes tratadas con L-NAME, comparadas con ratas no gestantes tratadas con dosis iguales de L-NAME^{18, 30}. Asimismo, en algunos estudios se determinó la concentración, tanto en el plasma como en la orina, de nitritos/nitratos en mujeres preeclámpicas y los resultados mostraron que hay discrepancia en cuanto a si aumenta o disminuye la producción de NO⁸.

Se ha reportado, en estudios en ratas con embarazo tardío, que la cantidad de NOS endotelial renal (eNOS) disminuye en un 39%, mientras que la NOS inducible renal (iNOS) y la neuronal (nNOS) incrementan 31% y 25%, respectivamente⁷. Estos datos sugieren la interesante posibilidad de que la producción aumentada de NOS durante el embarazo normal en ratas se produce por la sobreexpresión (*upregulation*) de iNOS y nNOS en el riñón y, tal vez, eNOS en los vasos sanguíneos¹.

¿El NO derivado de alguna de las isoformas NOS podría producir hipertensión durante el embarazo? Ésta es una incógnita por resolver; ya que, en primera instancia, pensaríamos que si la respuesta fuese afirmativa sería contraria a lo esperado; sin embargo, estudios recientes sugieren que los ratones knockout del gen NOS no se convierten en hipertensos durante el embarazo⁵⁶.

II. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que la preeclampsia representa un problema de salud pública importante por una alta morbilidad y mortalidad materno-fetal; y aunque existen varias teorías acerca de la fisiopatología de este padecimiento, se ha explorado poco sobre los mecanismos que subyacen a las respuestas a diferentes vasoconstrictores y su contribución al desarrollo de la enfermedad. Si bien, existen diversos modelos animales de preeclampsia, esta patología es exclusiva del ser humano, por lo cual, y sin restar valor a la información generada en los modelos experimentales, el acercamiento ideal para el estudio de la preeclampsia lo representan las placentas humanas, debido a que la placenta es el principal modulador de la nutrición de la unidad feto-placentaria y a que la obtención de las muestras resulta no invasiva para las pacientes.

El presente trabajo pretende contribuir al conocimiento de la fisiopatología de la preeclampsia, realizando especial énfasis en los niveles proteicos de diversos receptores y enzimas, en vasos de placentas obtenidas de mujeres que cursaron con embarazo normal y con un embarazo complicado por preeclampsia. Por lo anterior planteamos la siguiente pregunta:

¿Cómo son los niveles proteicos de los receptores (receptores: a la angiotensina II y a la bradicinina) y de las enzimas (sintasa de óxido nítrico endotelial y ciclooxigenasas) en arterias placentarias de mujeres preeclámpticas?

III. HIPÓTESIS

Existen cambios en los niveles de los receptores y enzimas placentarios en la preeclampsia.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles proteicos de diversos receptores y enzimas en las arterias placentarias en el embarazo normal y en la preeclampsia.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la expresión proteica de la sintasa endotelial del óxido nítrico (NOS₃) y de las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) en las arterias placentarias en el embarazo normal y en la preeclampsia.
2. Determinar la expresión proteica de los receptores a la angiotensina II (AT₁ y AT₂) y a la bradicinina (B₁ y B₂) en las arterias placentarias en el embarazo normal y en la preeclampsia.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material biológico

Se emplearon placentas obtenidas, en los meses de mayo y junio del 2008, por parto eutócico o cesárea electiva, de mujeres internadas en el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital General “Dr. Miguel Silva” de la ciudad de Morelia, Michoacán.

2. Grupos experimentales

Las placentas se clasificaron en 2 grupos:

- 1) Placentas provenientes de pacientes que cursaron con embarazo normal (n= 15).
- 2) Placentas provenientes de pacientes con embarazo complicado con preeclampsia (n= 7).

3. Criterios de inclusión, de exclusión y de no inclusión.

Los criterios de inclusión, de exclusión y de no inclusión se fijaron de acuerdo al Comité de Terminología del American College of Obstetricians and Gynecologists (1972) y al Lineamiento Técnico 2007, Secretaría de Salud, México y son los siguientes:

A) Criterios de inclusión

1. Embarazo normal:

- a) Pacientes con TA normal (< 140/90 mmHg)

-
- b) Ausencia de proteinuria
 - c) Sin complicaciones médicas u obstétricas

2. Preeclampsia:

- a) TAS $\geq$ 140mm Hg o incremento $\geq$ 30mm Hg sobre la TAS normal
- b) TAD $\geq$ 90mm Hg o incremento $\geq$ 15mm Hg sobre la TAD normal
- c) TA media: $\geq$ 106mm Hg
- d) Proteinuria en orina de 24 h: 300 mg en 24h o $\geq$ 100 mg/dl en una muestra al azar
- e) Edema persistente en extremidades y cara

B) Criterios de exclusión

- a) Presencia de hipertensión exclusivamente
- b) Presencia de proteinuria exclusivamente
- c) Presencia de edema exclusivamente

C) Criterios de no inclusión

- a) Negación para participar por parte de la paciente.
- b) Imposibilidad para conseguir la muestra

4. Transporte, disección vascular, conservación y eliminación de las placentas

Después de haber conseguido la placenta, se colocó en un recipiente especial para dicho fin, herméticamente cerrado y completamente limpio, el cual contenía solución de Krebs fría ($\square$ 15°C) que la cubría totalmente; dicho recipiente se depositó dentro de una hielera y de esa manera fue trasladada al laboratorio de Farmacología Cardiovascular de la División de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, donde se procesó de acuerdo al protocolo experimental previsto.

La eliminación de las muestras biológicas se llevó a cabo basándonos en el procedimiento vigente en la Facultad de Ciencias Médicas y biológicas “Dr. Ignacio Chávez” cuyo destino final fue el utilizado para desechar residuos biológicos infectocontagiosos de cuyo proceso se encarga una empresa privada, recogiendo los periódicamente.

5. Preparacion del tejido

Una vez obtenidas las muestras, se disecaron las arterias coriónicas superficiales y se limpiaron removiendo la grasa y el tejido conectivo; se sumergieron en una solución de Krebs-Henseleit (mM): NaCl, 118; KCl, 4.7; KH_2PO_4 , 1.2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.5; NaHCO_3 , 25; dextrosa, 11.7 y EDTA, 0.026 para extraer el exceso de sangre. Posteriormente, se sometieron a ultracongelación (-70°C) hasta el momento de su procesamiento para la inmunodetección por western blot.

6. Análisis de los receptores AT₁ y AT₂; B₁ y B₂ y de las enzimas NOS₃, COX-1 y COX-2 por Western Blot

Se tomaron 100 mg, aproximadamente, de las arterias coriónicas aisladas (n=15 y n=8, placentas normales y de preeclampsia, respectivamente); se cortaron finamente con tijeras pequeñas; evitando que se calentara la muestra, se realizó el homogenizado de manera interrumpida y al final se dejó enfriar 5 minutos, a la temperatura ambiente. Se centrifugaron por 5 minutos a 10 000 rpm; se desechó el precipitado y se recuperó la porción soluble.

Se tomaron 3 alícuotas de 30 µg y una de 10 µg para realizar la curva de calibración y la determinación de proteínas. Se construyó la curva de calibración con Excel (Microsoft Office) y, por extrapolación, se estimó la concentración de proteína de las muestras, empleando la ecuación de la línea recta.

Posteriormente, se desnaturalizaron las proteínas en solución RIPA, que contiene una mezcla de inhibidores de proteasas. Se obtuvo la concentración de proteína total presente en cada una de las muestras por el método de Lowry modificado, [cuya modificación nos permite observar la coloración de la muestra más pronto (a los 5 minutos) y que ésta perdure por más tiempo (45 minutos)] con el empleo de albúmina sérica bovina (BSA). Las muestras se leyeron a una longitud de onda de 750 nm. Se realizó una curva de calibración. Se mezclaron 50µg de cada una de las muestra con *buffer* de carga (que contenía β-

mercaptoetanol y urea 5M; agentes desnaturalizantes extremos), después las muestras se llevaron a ebullición, en un baño maría durante 10 minutos.

Con una jeringa (Hamilton), sin tocar el fondo del pozo, se cargaron el marcador de peso molecular (en el carril número 1) y las muestras en el gel de poliacrilamida-sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE) al 10%, separándose las proteínas mediante electroforesis (Bio-Rad); las condiciones de la misma fueron las siguientes: 110 voltios /2 horas.

Una vez separadas las proteínas presentes en el gel, se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinildieno (PVDF), empleando un equipo de transferencia en semiseco (semi-dry trans-blot; Bio-Rad) durante 45 minutos a 15 voltios y 400mA. La membrana y el papel se empaparon con el *buffer* de transferencia.

Se verificó la transferencia con una solución de rojo de Ponceau (control de carga). Posteriormente, la membrana se lavó e incubó en leche al 5%, para bloquear la superficie (durante una hora). La membrana se incubó con una solución 1:500 de los anticuerpos primarios, policlonales de cabra (Santa Cruz Biotechnology), específicos anti- AT₁ y AT₂; B₁ y B₂; y anti- NOS3, COX-1 y COX-2 en la misma solución láctea. La membrana se permaneció en agitación toda la noche o durante 4 h a la temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se recuperaron los anticuerpos, la membrana se lavó con TBS-T, tres veces, con intervalos de 5 min, en agitación constante para remover las uniones inespecíficas.

Después, las membranas se incubaron con solución 1:1000 de anticuerpos anticabra, durante 1 hora. Los anticuerpos anti-cabra estaban conjugados con una peroxidasa de rábano, que al estar en contacto con el sustrato (luminol; ECL Western Blot detection system, Amersham Biosciences) produjeron una reacción quimioluminiscente.

En estas condiciones, se revelaron en placas radiográficas y se digitalizaron las bandas con el empleo de un escáner (HP Scanjet G4050; Hewlett Packard), guardándose en una computadora para el posterior análisis densitométrico.

Se utilizó el anticuerpo anti- α -actina (Santa Cruz Biotechnology) para normalizar las bandas obtenidas de enzimas y receptores placentarios y no se encontró diferencia en las pacientes normotensas, en relación con las preeclámpticas. La α -actina es una proteína estructural del citoesqueleto, con PM aproximado de 43 kDa. Se graficó el promedio de la concentración de esta proteína $\pm$ el error estándar, en los vasos coriónicos de ambos grupos, (gráfica presente en los anexos).

7. Manejo de los resultados

En el análisis densitométrico se empleó el programa Image J para medir la intensidad de las bandas. Los niveles de cada una de las proteínas estudiadas se normalizaron, con la densitometría de la α -actina presentada por la muestra en la misma membrana. Los resultados se expresaron como el promedio $\pm$ el error estándar y las gráficas se construyeron en Sigma Plot 2008, versión 11.0.

8. Análisis estadístico

Para determinar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los dos grupos: el de normotensas y el de preeclampsia se realizaron análisis de varianza de una vía, seguidos del método Holm-Sidak. Cuando los datos no presentaron una distribución normal se aplicó un análisis de varianza por rangos (Kruskal-Wallis), seguido la prueba de Dunn.

VII. RESULTADOS

1. PARÁMETROS CLÍNICOS

1.1. Registro de la tensión arterial

Para efectuar el diagnóstico de preeclampsia de acuerdo a las normas internacionales y a la Norma Oficial Mexicana el primer parámetro a considerar fue la medición de la cifras tensionales. Los resultados mostraron que, la TA sistólica presentó un aumento cercano al 50% en el grupo de preeclámpticas, al compararlas con el grupo de normotensas ($p < 0.001$; fig. 1A). En cuanto a la TA diastólica, ésta se elevó, aproximadamente en un 30%, en el grupo de las preeclámpticas comparado con los valores del grupo de normotensas ($p < 0.001$; fig. 1B). Además, las cifras de TA media fueron: 85 mmHg en el grupo de normotensas y 122 mmHg para el grupo de pacientes preeclámpticas, esta última cifra cabe dentro de los criterios de hipertensión. Con base en lo anterior, las cifras tensionales presentadas por el grupo de preeclámpticas caen dentro de los rangos de la clasificación de hipertensión durante el embarazo.

1.2. Proteinuria y edema

Para completar el diagnóstico de preeclampsia se determinó la proteinuria en las pacientes preeclámpticas y las cifras promedio fueron de 332.5 mg/dl. No se determinó la presencia de proteinuria en las pacientes normotensas. Sin embargo, la presencia de albúmina en orina de las pacientes preeclámpticas apoya el diagnóstico. En cuanto al edema, consideramos que a pesar de ser un

criterio para el diagnóstico de preeclampsia no es un dato determinante, como lo son la hipertensión y la proteinuria. De hecho, la mayoría de las pacientes embarazadas presentan algún grado de edema. Sin embargo, el edema fue un dato común en las pacientes preeclámpticas.

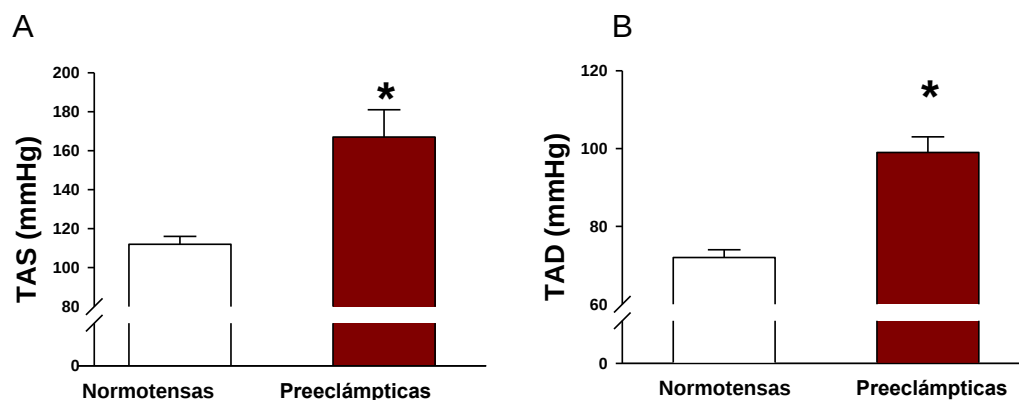


Figura 1. Cifras de tensión arterial (mmHg) sistólica (panel A) y diastólica (panel B) de pacientes con embarazo normal (barra clara) y de pacientes con preeclampsia (barra oscura). Cada barra representa el promedio $\pm$ el error estándar de 15 pacientes normotensas y 7 pacientes preeclámpticas (* $p < 0.001$ vs. normotensas).

1.3. Semanas de gestación

La duración del embarazo se mide en semanas de gestación y se considera a partir de la fecha de la última menstruación; sin embargo, es de utilidad la correlación entre el dato anterior con la altura del fondo uterino y la edad gestacional estimada por ultrasonido. Los resultados obtenidos mostraron una diferencia de 4 semanas entre ambos grupos (normotensas 39 semanas vs.

preeclámplicas 35 semanas); es decir, el embarazo duró 4 semanas menos en el grupo de preeclámpticas ($p<0.001$; fig. 2).

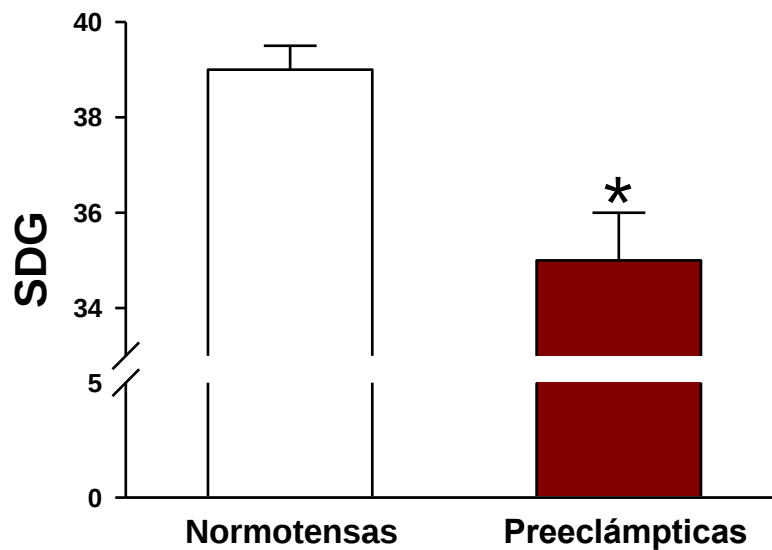


Figura 2. Semanas de gestación (SDG) de las pacientes con embarazo normal y de pacientes con preeclampsia. Cada barra representa el promedio $\pm$ el error estándar de 15 pacientes normotensas y 7 pacientes preeclámpticas (* $p<0.001$ vs. normotensas).

1.4. Peso y talla de los recién nacidos

Durante la preeclampsia hay una restricción del crecimiento intrauterino debido a la isquemia/hipoxia placentarias e intrauterinas. Además, tomando en cuenta que la duración del embarazo es menor en la preeclampsia se espera un producto más pequeño de acuerdo a la edad gestacional. Los resultados evidenciaron que los hijos de las pacientes preeclámpticas pesaron alrededor de 1 kg menos que los hijos de madres normotensas ($p<0.01$; fig. 3). Al realizar el

análisis por género observamos que se mantienen estas diferencias (no se muestran estos resultados).

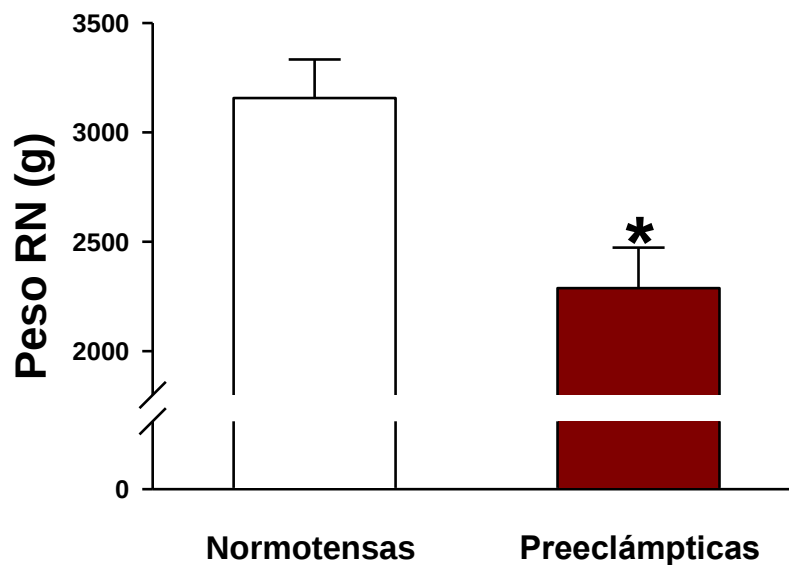


Figura 3. Peso de los recién nacidos (g) de las pacientes con embarazo normal y de pacientes con preeclampsia. Cada barra representa el promedio $\pm$ el error estándar de 15 hijos de madres normotensas y 7 hijos de madres preeclámpticas (* $p < 0.001$ vs. normotensas).

Otro parámetro antropométrico de los recién nacidos es la talla, el cual se relaciona directamente con el peso y, debido a la restricción del peso intrauterino se espera una talla menor en los hijos de madres preeclámpticas. Nuestros resultados mostraron una disminución significativa ($p < 0.001$) en la talla de los hijos de las pacientes preeclámpticas (fig. 4). Al realizar el análisis por género

observamos que se mantienen estas diferencias (no se muestran estos resultados).

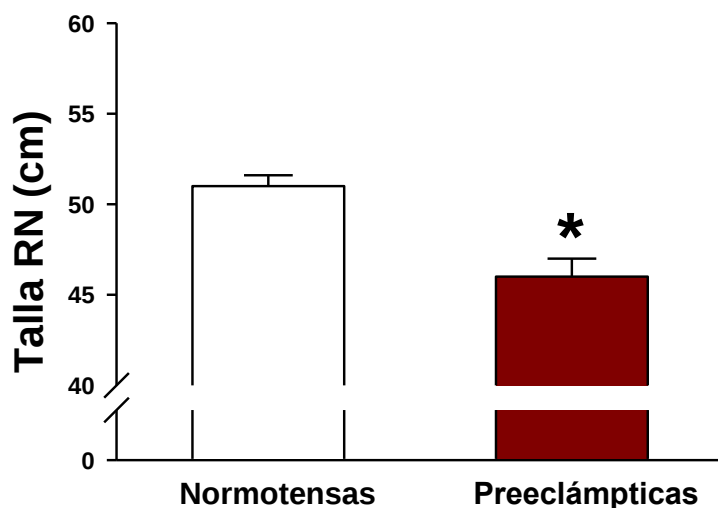


Figura 4. Talla de los recién nacidos (cm) de las pacientes con embarazo normal y de pacientes con preeclampsia. Cada barra representa el promedio $\pm$ el error estándar de 15 hijos de madres normotensas y 7 hijos de madres preeclámpticas (* $p < 0.001$ vs. normotensas).

2. DETERMINACIONES MOLECULARES

2.1. Niveles de las enzimas NOS₃, COX-1 y COX-2 en vasos placentarios

Para determinar los niveles enzimáticos de la sintasa endotelial de óxido nítrico (NOS₃) y de las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) en vasos placentarios de pacientes con embarazo normal y con preeclampsia, se realizó una electroforesis (SDS-PAGE) seguida de una transferencia e inmunodetección, empleando anticuerpos específicos contra las enzimas antes mencionadas y una reacción quimioluminiscente. Los pesos de las bandas obtenidas fueron de 130 kDa para la NOS₃, de 30 kDa para la COX-1 y de 70 kDa para la COX-2, aproximadamente.

En todos los casos, los datos fueron normalizados con la expresión de una proteína control (α -actina con peso molecular de 43 kDa).

Los resultados mostraron que la sintasa de óxido nítrico endotelial se detectó tanto en vasos placentarios de mujeres normotensas como en vasos de mujeres preeclámpticas; sin embargo, los niveles de esta enzima fueron significativamente mayores ($p<0.01$) en los vasos provenientes de mujeres con preeclampsia (figura 5).

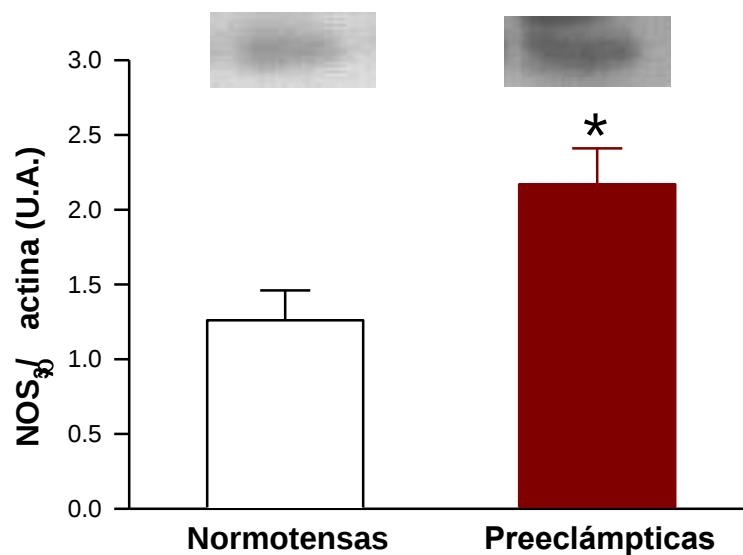


Figura 5. Niveles proteicos de la sintasa de óxido nítrico endotelial (NOS3) en vasos placentarios provenientes de pacientes con embarazo normal y de pacientes con preeclampsia.. Los datos fueron normalizados con la expresión de una proteína control (α -actina). Las barras representan el promedio $\pm$ el error estándar de 15 pacientes normotensas y 7 pacientes preeclámpticas y son expresados en unidades arbitrarias (U.A.). En la parte superior se muestran bandas correspondientes a un experimento típico. * $p<0.01$ vs. normotensas.

Por otro lado, la COX-1 se detectó tanto en vasos placentarios de mujeres normotensas y de mujeres con preeclampsia; sin embargo, los niveles proteicos

no mostraron diferencias entre ambos grupos (fig. 6). La COX-2 también se detectó en vasos placentarios de mujeres de ambos grupos; sin embargo, los niveles de esta enzima fueron significativamente menores ($p<0.01$) en los vasos provenientes de mujeres con preeclampsia (fig. 7).

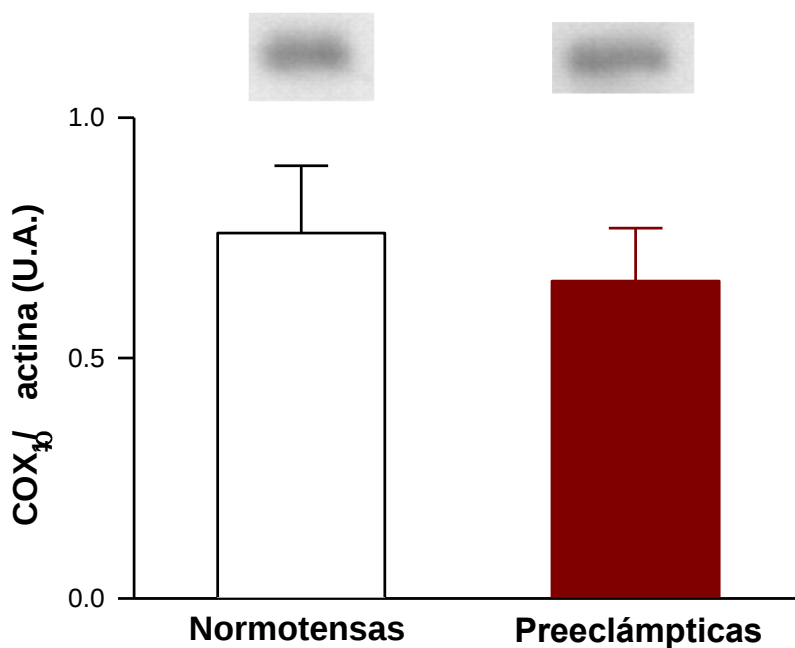


Figura 6. Niveles proteicos de la ciclooxygenasa-1 (COX-1) en vasos placentarios provenientes de pacientes con embarazo normal y de pacientes con preeclampsia.. Los datos fueron normalizados con la expresión de una proteína control (α -actina). Las barras representan el promedio $\pm$ el error estándar de 15 pacientes normotensas y 7 pacientes preeclámpticas y son expresados en unidades arbitrarias (U.A.). En la parte superior se muestran bandas correspondientes a un experimento típico. * $p<0.01$ vs. normotensas.

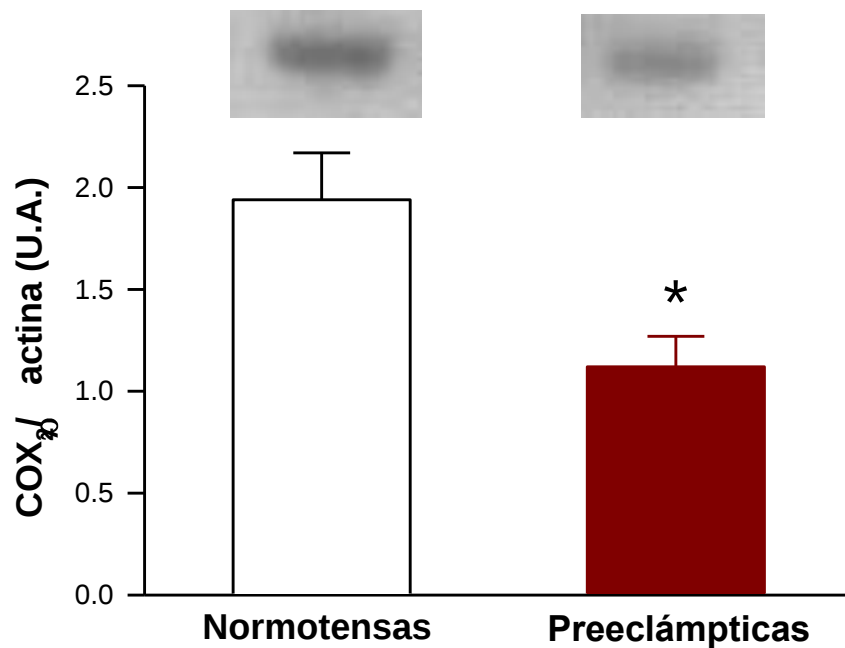


Figura 7. Niveles proteicos de la ciclooxygenasa-2 (COX-2) en vasos placentarios provenientes de pacientes con embarazo normal y de pacientes con preeclampsia.. Los datos fueron normalizados con la expresión de una proteína control (α -actina). Las barras representan el promedio $\pm$ el error estándar de 15 pacientes normotensas y 7 pacientes preeclámpticas y son expresados en unidades arbitrarias (U.A.). En la parte superior se muestran bandas correspondientes a un experimento típico. * $p < 0.01$ vs. normotensas.

2.2. Niveles de los receptores a la angiotensina II (AT_1 y AT_2) y a la bradicinina (B_1 y B_2) en vasos placentarios

2.2.1. Niveles proteicos de los receptores a la angiotensina II (AT_1 y AT_2)

La determinación de los niveles proteicos de los receptores de angiotensina II (AT_1 y AT_2) en vasos placentarios de pacientes con embarazo normal y con preeclampsia se realizó, igualmente, por electroforesis (SDS-PAGE), transferencia e inmunodetección y se emplearon, asimismo, anticuerpos específicos contra los

receptores AT₁ (peso molecular de 70kDa) y AT₂ (peso molecular de 50kDa) de la angiotensina y se realizó una reacción quimioluminiscente. Los pesos de las bandas obtenidas coincidieron con los datos conocidos. Los resultados mostraron que los receptores de angiotensina II, AT₁ y AT₂, se detectaron también tanto en vasos placentarios de mujeres normotensas como en vasos de mujeres preeclámpticas; sin embargo, los niveles de ambos receptores tendieron a disminuir en las mujeres preeclámpticas, aunque dicha disminución fue estadísticamente significativa sólo para los receptores AT₂ (p<0.05), no así para los receptores AT₁ (figura 10).

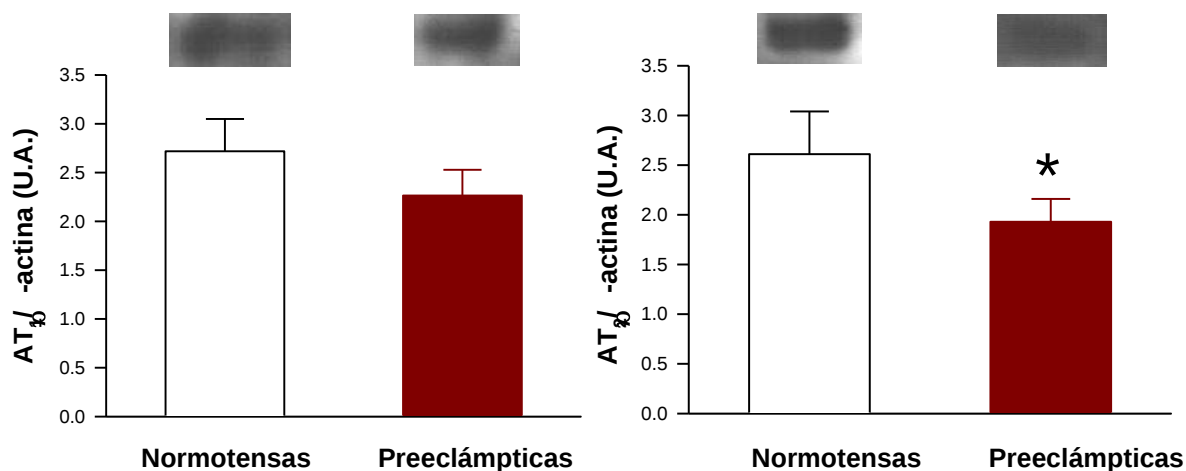


Figura 10. Niveles proteicos de los receptores AT₁ (panel A) y AT₂ (panel B) de angiotensina II en vasos placentarios provenientes de pacientes con embarazo normal y de pacientes con preeclampsia. Los datos fueron normalizados con la expresión de una proteína control (α-actina). Las barras representan el promedio ± el error estándar de 15 pacientes normotensas y 7 pacientes preeclámpticas y son expresados en unidades arbitrarias (U.A.). En la parte superior se muestran bandas correspondientes a un experimento típico.

2.2.2. Niveles proteicos de los receptores a Bradicinina (B_1 y B_2).

La determinación de los niveles proteicos de los receptores de bradicinina (B_1 y B_2) en vasos placentarios de pacientes con embarazo normal y con preeclampsia se realizó, igualmente, de la manera ya descrita para los otros receptores y enzimas, empleándose los anticuerpos específicos contra los receptores B_1 (peso molecular de 34kDa) y B_2 (peso molecular de 70kDa) de la bradicinina y se obtuvieron los siguientes resultados: los pesos de las bandas obtenidas fueron de 34 kDa para los receptores B_1 y de 70 kDa para los receptores B_2 , aproximadamente.

Los resultados mostraron que los receptores de bradicinina B_1 y B_2 se detectaron tanto en los vasos placentarios de mujeres normotensas como en los de mujeres preeclámpticas; sin embargo, hubo tendencia a la disminución en los niveles del receptor B_1 en las mujeres preeclámpticas, sin ser estadísticamente significativa (Figura 11-A); por otra parte, se observó un franco aumento en los niveles de los receptores B_2 ($p < 0.05$) en los vasos coriónicos de las pacientes preeclámpticas, el cual resultó de trascendencia estadística (figura 11-B).

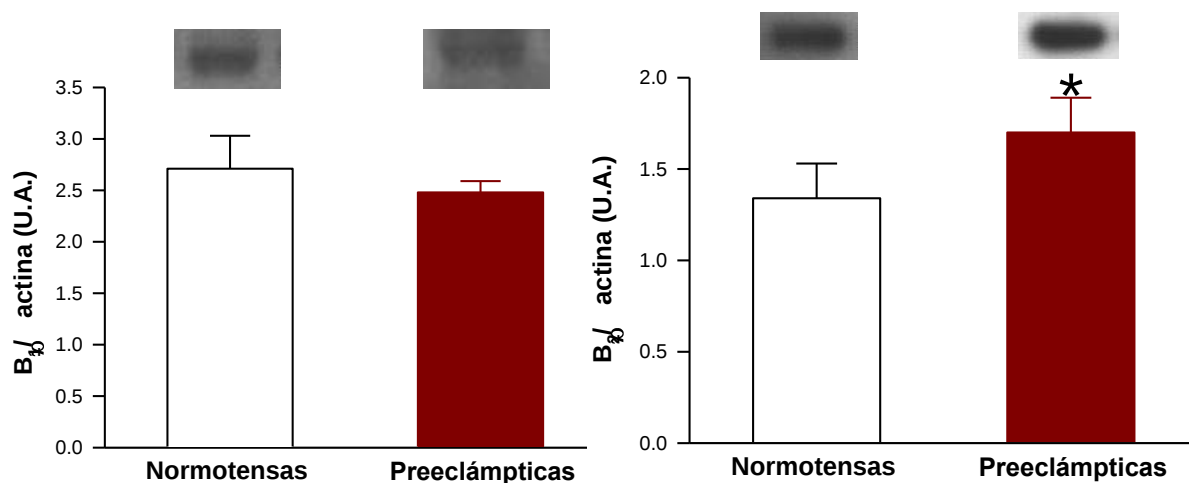


Figura 11. Niveles proteicos de los receptores B₁ y B₂ de la bradicinina en vasos placentarios provenientes de pacientes con embarazo normal y de pacientes con preeclampsia. Los datos fueron normalizados con la expresión de una proteína control (α -actina). Las barras representan el promedio $\pm$ el error estándar de 15 pacientes normotensas y 7 pacientes preeclámpticas y son expresados en unidades arbitrarias (U.A.). En la parte superior se muestran bandas correspondientes a un experimento típico.

VIII. DISCUSIÓN

En nuestro estudio, los datos clínicos que encontramos en las pacientes que cursaron con preeclampsia (cifras tensionales elevadas, proteinuria y alteraciones en las pruebas clínicas maternas; peso y talla baja en los recién nacidos) confirman y apoyan, el diagnóstico de preeclampsia. En cuanto a los resultados moleculares, que fueron objetivo de la investigación, nuestros principales hallazgos fueron los siguientes:

1. El receptor AT_2 de la angiotensina II lo encontramos disminuido.
2. El receptor de bradicinina B_1 tendió a disminuir, mientras que el receptor B_2 aumentó de manera estadísticamente significativa en la preeclampsia.
3. En cuanto a los niveles de las enzimas ciclooxygenasas, la COX-1 no se observaron modificaciones en su expresión, mientras que la COX-2 disminuyó de manera considerablemente significativa.
4. Los niveles de la sintasa endotelial del óxido nítrico (NOS_3) se encontraron elevados en los vasos placentarios de las pacientes preeclámpticas.

A la vista de nuestros resultados, podemos evidenciar la clara disfunción endotelial presente en la preeclampsia.

Los receptores para angiotensina II presentaron una tendencia a disminuir, especialmente el receptor AT_2 , un receptor que, como se sabe, media la vasodilatación y durante el embarazo normal se esperaría que estuviese aumentado, mientras que en la preeclampsia se encontraría disminuido, pudiendo

establecer uno de los mecanismos compensatorios fallidos que dan lugar a las manifestaciones maternas de la preeclampsia, presentes cerca del término del embarazo y constituyen la segunda etapa de la preeclampsia³². Se desconocen los mecanismos precisos que pudieran dar lugar a la disminución de este receptor en la preeclampsia; sin embargo, se ha reportado la presencia de autoanticuerpos agonísticos de ambos receptores de angiotensina II³², cuya interacción con los mismos, pueden dar lugar a una respuesta sinérgica propia de cada uno de los receptores con los que se unen, es decir, a vasoconstricción con el AT₁ o a vasodilatación con el AT₂. De igual manera, la unión de los autoanticuerpos puede dar lugar a una respuesta antagónica por el simple hecho de ocupar el receptor, quizás, dependiendo del grado de afinidad con el mismo o del daño que pudiera haber en la estructura del receptor a causa de las lesiones producidas en los vasos durante la preeclampsia⁵⁴.

En nuestro estudio, encontramos al receptor AT₁ en los vasos coriónicos de las mujeres preeclámpticas, con una tendencia a disminuir; dicho receptor media la vasoconstricción y pudiera esperarse que estuviese aumentado, considerando que sería un factor importante responsable de la vasoconstricción y del aumento en las resistencias periféricas. Tal situación supuesta coincidiría con los resultados observados por Leung y colaboradores³³, que reportan una sobreexpresión de dichos receptores en la placenta durante la preeclampsia. Las diferencias entre los resultados del presente trabajo y los del reporte de Leung pueden deberse a que ellos midieron el receptor a nivel del RNAm y en nuestro estudio medimos la

expresión de la proteína. Lo anterior nos sugiere que la presencia del receptor puede estarse regulando a nivel traduccional. Por lo anterior, creemos que en la preeclampsia hay una desorganización de las respuestas compensadoras y, por lo tanto una disfunción endotelial y, como consecuencia, no se produce una respuesta oportuna a los cambios placentarios que dan lugar a la hipoperfusión tisular intrauterina y a las propias respuestas de mediadores locales que pudieran determinar la liberación de neurotransmisores y moduladores que establezcan una respuesta sistémica materna y fetal.

La aparente disminución del receptor AT_1 , cuya interacción con la angiotensina II produce vasoconstricción, la explicamos como un intento no exitoso del organismo materno de aumentar la perfusión útero-placentaria, con un mecanismo autorregulatorio; ya que, se reporta además, que puede haber un aumento en los niveles de angiotensina II durante la preeclampsia y si sus receptores se encuentran disponibles para unirse a ella, esto aumentaría la severidad de la enfermedad. Así que, la disminución de estos importantes receptores de esta potente sustancia vasoconstrictora podría o sería un factor que favorece el mantenimiento de la perfusión placentaria y fetal dentro de los límites adecuados para suplir los requerimientos nutricionales fetales. Esta disminución del receptor AT_1 pudiese deberse también a un fenómeno inmunológico por la formación de autoanticuerpos, con los mismos fines de autorregulación⁵⁸.

Asimismo, se menciona en la literatura que la disminución de los receptores AT_1 en los vasos placentarios de mujeres preeclámpticas se ha visto asociada a la restricción del crecimiento intrauterino fetal³². Otros autores encontraron que, luego de la unión de la angiotensina II a sus receptores, se inicia su internalización y secuestro, reciclándose a la membrana plásmática sólo cerca del 25%, sugiriéndose que la degradación del receptor internalizado es el principal mecanismo por el cual la Ang II regula a sus propios receptores⁴¹. Quizás haya una mayor degradación de los receptores de Ang II en la preeclampsia⁵⁴ y esto contribuya también a la mayor disminución observada en nuestros experimentos. También podríamos argüir que las modificaciones observadas en la preeclampsia pueden deberse a factores tan diversos como genotipo, raza, cuestiones ambientales, nutricionales, etapa del embarazo, etc. y que se requeriría mayor investigación sobre todas estas variables para tratar de dilucidar los mecanismos involucrados en la etiología de un problema de salud tan complejo como la preeclampsia.

La tendencia a disminuir de la COX-1 y la disminución significativa de la COX-2 en la preeclampsia, puede tener implicaciones directas encaminadas a la disfunción endotelial y a la pérdida de la homeostasis, debido a que estas enzimas catalizan la síntesis de prostaglandinas, familia de autacoides vasodilatadores (p.ej., PGI_2) y vasoconstrictores (p.ej., TXA_2). Simplemente, confirmamos que, probablemente, la disminución en la COX-2 puede estar asociada con una disminución en la síntesis de prostaciclina (PGI_2) y de esta manera, contribuir a la

disfunción endotelial y este fenómeno puede ser otro intento orgánico fallido para disminuir el tono muscular de las arterias coriónicas y mejorar la perfusión tisular intrauterina y fetal. Asimismo, puede ocurrir también un aumento en la producción de tromboxano A_2 , lo cual crónicamente sería un factor contribuyente a la presentación de la coagulación intravascular diseminada, que se ha reportado como una complicación de la preeclampsia⁶¹.

Es conocido el papel primordial de las prostaglandinas, junto con otros moduladores endoteliales, en el mecanismo de la inflamación y la importancia que tienen como agentes relajantes del músculo liso endotelial y, por lo tanto como vasodilatadores, favoreciendo en este caso la perfusión tisular y eliminando la isquemia. De allí que, la disminución crónica de su síntesis pueda ser responsable de cambios sustanciales que den lugar a patología que nos ocupa. Creemos que el papel que juega la prostaciclina en el embarazo normal para mantener el tono del músculo liso vascular en los vasos placentarios y el diámetro apropiado en la luz arteriolar provee al feto de la irrigación sanguínea suficiente y adecuada para llevar los nutrientes, las hormonas, el oxígeno y todos los elementos que éste requiere. El hecho de que esté reducido el nivel de las ciclooxygenasas sugiere, indirectamente, y de manera muy probable que la prostaciclina está disminuida en la preeclampsia y es uno de los factores que contribuye a agravar esta condición⁶³.

Paradójicamente con las ciclooxygenasas, la sintetasa endotelial de óxido nítrico (NOS_3) y el receptor de bradicinina B_2 , que forman parte de la vía del NO,

los encontramos aumentados. Se acepta que, a nivel de los vasos placentarios se encuentra la génesis de la preeclampsia debido a la deficiente remodelación-destrucción de las arterias espirales uterinas por la escasa y superficial invasión trofoblástica, preservando éstas su estructura original y dando lugar a hipoperfusión útero-placentaria e isquemia tisular. La isquemia en tejidos fetales ocasiona, a su vez, restricción en el crecimiento intrauterino y aumenta la producción y la síntesis de moduladores endoteliales vasodilatadores que tratan de compensar esa deficiencia en la irrigación. Tales moduladores serían, pues, entre otros, el óxido nítrico y la prostaciclina.⁵⁶

Como elementos adicionales y absolutamente reconocidos como neuromoduladores del tono simpático, tenemos a los receptores adrenérgicos⁵² y al sistema nervioso simpático, los cuales también juegan, probablemente, un papel importante en la hipoperfusión útero-placentaria y en las manifestaciones maternas de la enfermedad observadas en la preeclampsia; Todos estos hechos nos sugieren una múltiples y dinámicos mecanismos de adaptación por parte del organismo o, quizás, una mayor internalización y degradación o glicolización de receptores y la disminución en el reciclaje hacia la membrana plasmática por mecanismos no bien conocidos.

Como colofón, podríamos decir que, en la preeclampsia, conocida como la enfermedad de las teorías, tenemos un largo camino por recorrer para entender totalmente su etiología y su fisiopatogenia (campo que nos ocupa) y que, con nuestros resultados, mostramos que el organismo se adapta de manera muy

dinámica, tratando de revertir los mecanismos patogénicos con respuestas compensadoras complejas y controversiales, diferentes y hasta antagónicas en diferentes poblaciones, quizás debidas a las propias circunstancias individuales y colectivas, así como a factores ambientales que habría que determinar^{47, 48, 49, 50}.

IX. CONCLUSIONES

1. Podemos concluir que, la preeclampsia modifica la expresión de enzimas responsables de la producción de agentes vasodilatadores, como la prostaciclina (PGI_2) y el óxido nítrico y vasoconstrictores como el tromboxano (TXA_2). Estas modificaciones pueden contribuir a la fisiopatogenia de la preeclampsia.
2. Existen cambios en los niveles de los receptores de Ang II (AT_1 y AT_2) en vasos coriónicos placentarios, tanto en pacientes normotensas como en preeclápticas que pueden favorecer la vasopresión manifiesta en la preeclampsia.
3. Las modificaciones en los niveles de la NOS_3 y de los receptores a la bradicinina B_2 nos sugiere que hay una hiperactividad de la vía del óxido nítrico que puede ser compensatoria al aumento en la tensión arterial.

X. PERSPECTIVAS

1. Para tener la certeza de que, al modificarse la expresión de las ciclooxigenasas, disminuye la síntesis de prostanoides (tromboxano A₂ y prostaciclina), tendríamos que determinar directamente los niveles de ambos (o de sus metabolitos) en el plasma.
2. Determinar los niveles del NO *in situ*, por medios electroquímicos, o de sus metabolitos (nitratos y nitritos), por el método de Griess.
3. Medir la angiotensina II, la bradisinina, catecolaminas y hormonas sexuales (estrógenos y progesterona), por medio de ensayos de ELISA.
4. Medir los niveles de otros moduladores endoteliales, como la endotelina.
5. Asimismo, se tendría que seguir investigando para medir ahora directamente en el plasma (materno, placentario, umbilical o del recién nacido) los niveles de todos estos moduladores y así encontrar la correlación que existe o pudiese existir entre lo que observamos molecularmente en las enzimas y los receptores y la observación directa en los niveles de los propios moduladores.

XI. REFERENCIAS

1. **Alexander BT, Miller MT, Kassab S, et al.** Differential expression of renal nitric oxide synthase isoforms during pregnancy in rats. *Hypertension* 1999; 33: 435-439.
2. **Alexander BT, Rinewalt AN, Cockrell KL, et al.** Endothelin type A receptor blockade attenuates the hypertension in response to chronic reductions in uterine perfusion pressure. *Hypertension* 2001; 37: 485-489.
3. **Anumba DO, Robson SC, Boys RJ, et al.** Nitric oxide activity in the peripheral vasculature during normotensive and preeclamptic pregnancy. *Am J. Physiol Heart Circ Physiol* 1999; 277: H848-H854.
4. **Arunlakshana, O & Schild, HO.** Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol* 1959; 14: 48-58.
5. **August P, Lindheimer MD.** Pathophysiology of preeclampsia. En: *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*, edited by Laragh JH and Brenner BM. New York: Raven 1995; 2407-2426.
6. **August P.** Preeclampsia: new thoughts on an ancient problem. *J Clin Hypertens* 2000; 2:115-123.
7. **Baergen RN.** Manual of Benirschke and Kaufmann's Pathology of the Human Placenta Ed. Springer. New York Presbyterian Hospital-Weill Medical College of Cornell University, New York, NY 10021, USA, 2005.
8. **Baylis C, Suto T, and Conrad KP.** Importance of nitric oxide in control of systemic and renal hemodynamics during normal pregnancy: studies in the rat and implications for preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 1996; 15: 147-169.
9. **Bracho-Valdés I, Godínez-Hernández D, Arroyo-Vicelis B, et al.** Increased alpha-adrenoceptor expression in pregnant rats with subrenal aortic coarctation. *Hypertension in Pregnancy* 2009; 00: 1-15.
10. **Bobadilla LR, Hernández HD, Castillo HC, et al.** Prostaglandin nitric oxide interactions in rat aorta. *Proc West Pharmacol Soc* 1998; 41: 91-92.
11. **Bobadilla RA, Vastillo C, Valencia I, et al.** Segmental aortic differences in vascular responses during pregnancy. *Proc West Pharmacol Soc* 1996; 39: 37-38.
12. **Botella Llusía J.** Generalidades sobre la placenta, en: *La placenta. Fisiología y Patología*. Real Academia Nacional de Medicina. Madrid, España 1992; págs.25.
13. **Butt WR, Chand T, and Lles RK.** Hormones in the placenta. En: hCG and hPL. In Lamm GE, ED M Marshall's *Physiology of Reproduction* 1994; Vol 3, parte 1: 461-534.
14. **Capeless EL, Clapp JF.** Cardiovascular changes in early phase of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161: 1449-1453.
15. **Chambers JC, Fussi L, Malik IS, et al.** Association of maternal endothelial dysfunction with preeclampsia. *JAMA* 2001; 285: 1607-1612.
16. **Cid MC, Kleinman HK, Grant DS, et al.** Estradiol enhances leucocyte binding to tumor necrosis factor (TNF)-stimulated endothelial cells via an increase in TNF-induced adhesion molecules E-selectin, intercellular adhesion molecule type 1, and vascular cell adhesion molecule type 1. *J Clin Invest* 1994; 93: 17-25.

-
-
17. **Conrad KP.** Possible mechanisms for changes in renal hemodynamics during pregnancies: studies from animals models. *Am J D* 1987; 9: 253-259.
 18. **Crews KL, Novak J, Granger IP, et al.** Stimulated mechanisms of Ca^{2+} entry into vascular smooth muscle during NO synthesis inhibition in pregnant rats. *Am J. Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 1999; 276: R530-R538.
 19. **Dekker GA, Sibai BM.** Etiology and Pathogenesis of Preeclampsia: current concepts. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179 (5): 1359-1375.
 20. Detecting Pree-clampsia: a practical guide. Maternal health and safe motherhood programme. Division of family health. *World Health organization*. Geneva. Revised in 2005.
 21. **Dinesh MS.** Role of the rennin-angiotensin system in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288: F614-F625.
 22. **Duvekott JJ and Peeters LL.** Renal hemodynamics and volume homeostasis in pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 1994; 49: 830-839.
 23. **Fitzgerald DJ, Rocki W, Murray R, et al.** Tromboxane A_2 synthesis in pregnancy-induced hypertension. *Lancet* 1990; 335: 751-754.
 24. **Friedman EA.** Preeclampsia: a review of the role of prostaglandins. *Obstet Gynecol* 1988; 71: 122-137.
 25. **Friedman EA, Neff RK.** Pregnancy and Hypertension. A systematic Eval uation of Clinical Diagnostic Criteria. PSG Publishing 1977. Littleton, MA.
 26. **Gant NF, Daley GL, Chand S, et al.** A study of Angiotensin II Pressor Response throughout Primigravid Pregnancy. *J Clin Invest* 1973; 52: 2682-89.
 27. **Gisbert R, Noguera MA, Ivorra MD, et al.** Functional evidence of a constitutively active population of alpha (1D)-adrenoceptors in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295: 810-817.
 28. **Ibarra M, Terrón JA, López-Guerrero JJ, et al.** Evidence for an age-dependent functional expression of alpha 1D-adrenoceptors in the rat vasculature. *Eur J Pharmacol* 1997; 322: 221-224.
 29. **Jansakul C, Boura ALA, King RG.** Effects of endothelial cell removal on constrictor and dilator responses of aortae of pregnant rats. *J. Auton Pharmacol* 1989; 9: 93-101.
 30. **Khalil RA and Granger JP.** Vascular mechanisms of increased arterial pressure in preeclampsia: lessons from animal models. *Am J. Physil. Regulatory Integrative comp. Physiol* 2002; 283: R29-R45.
 31. **Khan KS, Wojdyla D, Say L, et al.** WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet* 2006; 367: 1066-107.
 32. **Lee S et al.** Posttranscriptional mechanisms contribute to osmotic regulation of Ang type 1 receptor in cultured rat renomedullary interstitial cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 290: R44-R49.
 33. **Leung PS, Tsai SJ, Wallukat G, et al.** The up regulation of angiotensin II receptor AT_1 in human preeclamptic placenta. *Mol Cell Endocrinology* 2001; 184: 95-102.
 34. **MacGillivray I, Rose Ga, Rowe B.** Blood pressure survey in pregnancy. *Clin Sci* 1969; 37: 395-407.
 35. **Manyonda IT, Slater DM, Fenske C, et al.** A role for noradrenaline in pre-eclampsia: towards a unifying hypothesis for the pathophysiology. *Br J Obstet Gynaecol* 1998; 105:641-648.
 36. **Marik PE.** Hypertension disorders of pregnancy. *Postgrad Med.* 2009 Mar; 121(2):69-76.

-
37. **Molnar MF.** N^G-nitro-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis, increases blood pressure in rats and reverses the pregnancy-induced refractoriness to vasopressor agents. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 1560-1567.
38. **OPARIL. WEBER.** "Hipertensión: el riñón, de Brenner y Rector". Ed. McGraw-Hill. México 2002.
39. **Page EW, Christianson R.** The impact of mean arterial pressure in the middle trimester upon the outcome of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1976; 125: 740-746.
40. **Paller MS.** Mechanism of decreased pressor responsiveness to ANG II, NE and vasopressin in pregnant rats. *Am J Physiol* 1984; 247: H100-H108.
41. **Pérez-Díaz I, Hiriart M, Olivares- Reyes JA, et al.** Receptores para la Angiotensina II diferentes a los clásicos receptores membranales AT1 y AT2: características y su papel en el funcionamiento celular. *REB* 2006; 25 (2): 55-60.
42. **Pérez y Pérez F, Pérez Gutiérrez F.** La placenta en los mamíferos, En: *La placenta. Fisiología y Patología. Real Academia Nacional de Medicina.* Madrid, España, 1992; pág.: 27-50.
43. **Piasek MT, Guarino RD, Smith MS, et al.** The specific contribution of the novel alpha-1D adrenoceptor to the contraction of vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 275: 1583-1589.
44. **Piasek MT, Hrometz SL, Edelmann SE, et al.** Immunocytochemical localization of the alpha-1B adrenergic receptor and the contribution of this and the other subtypes to vascular smooth muscle contraction: analysis with selective ligands and antisense oligonucleotides. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 283: 854-868.
45. **Poppas A, Shroff SG, Korcarz C, et al.** Serial assesment of the cardiovascular system in normal pregnancy. *Circulation* 1997; 95: 2407-2415.
46. Prevención, Diagnóstico y Manejo de la Preeclampsia-Eclampsia. LINEAMIENTO TÉCNICO. 2007 Secretaría de Salud. Centro Nacional de Equidad de Género y Salud reproductiva.
47. **Roberts JM.** Preeclampsia: what we know and what do not know. *Semin Perinatol* 2000; 24: 24-28.
48. **Roberts JM and Cooper DW.** Pathogenesis and genetics of preeclampsia. *Lancet* 2001; 357: 53-56.
49. **Roberts, MLMJ.** *Chesley's Hypertensive Diseases in Pregnancy.* 2nd ed. Stanford, CT: Appleton & Lange; 1999.
50. **Roberts JM, Taylor RN, and Goldfien A.** Clinical and biochemical evidence of endothelial cell disfunction in the pregnancy syndrome preeclampsia. *Am J Hypertension* 1991; 4: 700-708.
51. **Robson SC, Hunter S, Boys RJ, et al.** Serial study influencing changes in cardiac output during human pregnancy. *Am J. Physiol* 1989; 256: 1060-1065.
52. **Rouget C, Barthez O, Goirand F, et al.** Stimulation of the ADRB3 adrenergic receptor induces relaxation of human placental arteries: influence of preeclampsia. *Biol Reprod* 2006; 74:209-216).
53. **Salomonsson M, Brannstrom K, Arendshorst WJ.** Alpha (1)-adrenoceptor subtypes in rat renal resistance vessels: in vivo and in vitro studies. *Am Physiol Renal Physiol* 200; 278: F138-147.
54. **Sampson AK et al.** Enhance Ang II type 2 receptor mechanisms mediate decreases in arterial pressure attributable to chronic low dose Ang II in female rats. *Hypertension* 2008; 52: 666-667.

-
-
55. **Sánchez R.** Fisiopatología: el sistema renina angiotensina aldosterona. Fp SRAA CEP ARI SA, 2003.
 56. **Shesely EG, Gilbert C, Granderson G, et al.** Nitric oxide synthase gen knockout mice do not become hypertensive during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185: 1198-1203.
 57. **Sibai BM,** Maternal and Uteroplacental Hemodynamics for the Classification and Prediction of Preeclampsia. *Hypertension* 2008; 52: 805.
 58. **Sibai BM, McCubbin JH, Anderson GD et al.** Eclampsia: Observations from 67 recent cases. *Obstet Gynecol* 1981; 58: 609-613.
 59. **Siddiqi TA, Koenig BB, and Clark KE.** Pregnancy causes a decrease in the number and affinity of myometrial angiotensin II receptors. *Obstet Gynecol* 1986; 820-824.
 60. **Taylor RN, Varma M, Teng NN, et al.** Women with preeclampsia have higher plasma endothelin levels than women with normal pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 1675-1677.
 61. **Vigil-de Gracia P.** Maternal death due to preeclampsia and HELLP syndrome. Department of Obstetrics and Gynecology. Caja de Seguro Social, Panamá, Panamá. *Int. J Gynaecol* 2009 Feb; 104 (2): 90-4. Epub 2008 Nov 22.
 62. **Villalobos-Molina R, Ibarra M.** Alpha 1-adrenoceptors mediating contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the alpha 1D or alpha 1A subtypes. *Eur J Pharmacol* 1996; 298: 257-263.
 63. **Wang Y, Walsh SW, and Kay HH.** Placental lipid peroxides and thromboxane are increased and prostacyclin is decreased in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167: 946-949.
 64. **Wilson M, Morganti AA, Zervoudakis I, et al.** Blood pressure, the renin-aldosterone system and sex steroids throughout normal pregnancy. *Am J Med* 1980; 68: 97-104.

IX. ANEXOS

9.1. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

Título Segundo De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos, Capítulo I, en los siguientes artículos dice lo siguiente:

ARTÍCULO 20: Se entiende por consentimiento informado el acuerdo por escrito, mediante el cual el sujeto de investigación o, en su caso, su representante legal autoriza su participación en la investigación, con pleno conocimiento de la naturaleza de los procedimientos y riesgos a los que se someterá, con la capacidad de libre elección y sin coacción alguna.

ARTÍCULO 21: Para que el consentimiento informado se considere existente, el sujeto de investigación o, en su caso, el representante legal deberá recibir una explicación clara y completa, de tal forma que pueda comprenderla, por lo menos, sobre los siguientes aspectos:

- I.- La justificación y los objetivos de la investigación;
- II.- Los procedimientos que vayan a usarse y su propósito, incluyendo la identificación de los procedimientos que son experimentales;
- III.- Las molestias o los riesgos esperados;
- IV.- Los beneficios que puedan obtenerse;
- V.- Los procedimientos alternativos que pudieran ser ventajosos para el sujeto;
- VI.- La garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento del sujeto;
- VII.- La libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, sin que por ellos se creen prejuicios para continuar su cuidado y tratamiento;
- VIII.- La seguridad de que no se identificará al sujeto y que se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con su privacidad;
- IX.- El compromiso de proporcionarle información actualizada obtenida durante el estudio, aunque ésta pudiera afectar la voluntad del sujeto para continuar participando;
- X.- La disponibilidad de tratamiento médico y la indemnización a que legalmente tendría derecho por parte de la institución de atención a la salud, en el caso de daños que la ameriten, directamente causados por la investigación, y
- XI.- Que si existen gastos adicionales, éstos serán absorbidos por el presupuesto de la investigación.

ARTÍCULO 22.- El consentimiento informado deberá formularse por escrito y deberá reunir los siguientes requisitos:

- I. Será elaborado por el investigador principal, indicando la información señalada en el artículo anterior y de acuerdo a la norma técnica que emita la Secretaría;

-
-
- II. Será revisado y, en su caso, aprobado por la Comisión de Ética de la institución de atención a la salud;
 - III. Indicará los nombres y direcciones de dos testigos y la relación que éstos tengan con el sujeto de investigación;
 - IV. Deberá ser firmado por dos testigos y por el sujeto de investigación o su representante legal, en su caso. Si el sujeto de investigación no supiere firmar, imprimirá su huella digital y a su nombre firmará otra persona que él designe, y
 - V. Se extenderá por duplicado, quedando un ejemplar en poder del sujeto de investigación o de su representante legal.

ARTÍCULO 23.- En caso de investigaciones con riesgo mínimo, la Comisión de Ética, por razones justificadas, podrá autorizar que el consentimiento informado se obtenga sin formulario por escrito y, tratándose de investigaciones sin riesgo, podrá dispensar al investigador la obtención del consentimiento informado.

CAPÍTULO IV. De la investigación en Mujeres en Edad Fértil, Embarazadas, durante el Trabajo de Parto, Puerperio, Lactancia y Recién Nacidos; de la utilización de Embriones, Óbitos y Fetos y de la Fertilización Asistida.

ARTÍCULO 45.- Las investigaciones sin beneficio terapéutico en mujeres embarazadas, cuyo objetivo sea obtener conocimientos generalizables sobre el embarazo, no deberán presentar un mayor riesgo al mínimo para la mujer, el embrión o el feto.

ARTÍCULO 46.- Las investigaciones en mujeres embarazadas que impliquen una intervención o procedimiento experimental no relacionado al embarazo, pero con beneficio terapéutico para la mujer, como sería en casos de toxemia gravídica, diabetes, hipertensión y neoplasias, entre otros, no deberán exponer al embrión o al feto a un riesgo mayor al mínimo, excepto cuando el empleo de la intervención o procedimiento se justifique para salvar la vida de la mujer.

ARTÍCULO 47.- Las investigaciones en mujeres embarazadas, con beneficio terapéutico relacionado con el embarazo, se permitirán cuando:

- I. Tengan por objeto mejorar la salud de la embarazada con un riesgo mínimo para el embrión o feto, o
- II. Estén encaminadas a incrementar la viabilidad del feto, con un riesgo mínimo para la embarazada.

ARTÍCULO 50.- Las investigaciones en mujeres durante el puerperio se permitirán cuando no interfieran con salud de la madre y del recién nacido.

ARTÍCULO 55.- Las investigaciones con embriones, óbitos, fetos, nacimientos muertos, materia fetal macerada, células, tejidos y órganos extraídos de éstos, serán realizadas de acuerdo a lo dispuesto en el Título Décimo Cuarto de la Ley y en este Reglamento.

CAPÍTULO VI De la Investigación en Órganos, Tejidos y sus Derivados, Productos y Cadáveres de Seres Humanos,

ARTÍCULO 59 *que, a la letra, dice: “La investigación a que se refiere este Capítulo comprende la que incluye la utilización de órganos, tejidos y sus derivados, productos y cadáveres de seres humanos, así como el conjunto de actividades relativas a su obtención, conservación, utilización, preparación, suministro y destino final”.*

ARTÍCULO 60 *dice: “Esta investigación deberá observar, además del debido respeto al cadáver humano, las disposiciones aplicables estipuladas en el presente ordenamiento y lo establecido en el Título Décimo Cuarto de la Ley y su Reglamento en Materia de Control Sanitario de la Disposición de Órganos, Tejidos y Cadáveres de Seres Humanos”.*

9.2. Ética del estudio

La pacientes seleccionadas para el estudio serán informadas del procedimiento que llevará a cabo, mediante el documento de consentimiento informado, resaltando que dicho estudio no implica algún riesgo para la paciente ni para el recién nacido, ya que los procedimientos del mismo se realizaron en el tejido arterial de la placenta y se obtuvieron los datos clínicos de manera indirecta, a través del expediente clínico y algunos de ellos, cuando fue posible, directamente de la paciente.

FECHA: _____

CONSENTIMIENTO INFORMADO

YO, _____, en pleno uso de mis facultades mentales, doy mi autorización total e informada para participar en el estudio denominado "Evaluación molecular de diversos agentes vasoactivos en arterias placentarias de mujeres preeclámpticas michoacanas", bajo la responsabilidad de los doctores Víctor Manuel Farías Rodríguez, Daniel Godínez Hernández y Obdulia Ruiz González.

He recibido, además, información relativa a la finalidad del estudio.

Por lo anterior, doy mi consentimiento para la utilización de mi placenta con fines de investigación, sabiendo que no corro ningún riesgo al participar en este estudio.

Nombre y firma de la paciente _____

Nombre y firma de testigo _____

Nombre y firma de testigo _____

Lugar y fecha.

FICHA CLÍNICA

FECHA: -----
DATOS GENERALES DE LA PACIENTE

NOMBRE DE LA PACIENTE: -----
NÚM. DE EXPEDIENTE: -----

EDAD: -----	GESTA: -----
PARA: -----	ABORTOS: -----
CESÁREAS: -----	FUM: -----
TA: -----	FC: -----
FR: -----	

PESO: -----	TEMPERATURA: -----
PROTEINURIA: -----	PESO DE LA PLACENTA: -----
PATOLOGÍAS: -----	

USO DE MEDICAMENTOS: -----

NOTA POSTPARTUM:
SEXO DEL PRODUCTO: ----- TALLA: ----- APGAR: -----
PC: ----- PT: ----- PA: ----- TEMP: -----

SOLUCIONES

9.3. Preparación de soluciones para Western Blot

1. Solución stock de Acrilamida

La acrilamida es una neurotoxina. Siempre se deben usar guantes para su manejo y cubrebocas o máscara cuando se pesa el polvo. No se debe nunca pipetear la solución con la boca. Se debe almacenar a 4°C lejos de la luz.

2. Tris-Cl 1.5M, pH 8.8

Tris 1.5M 36.3 g
HCL 4 N a pH 8.8
H₂O desionizada a 200ml

3. Tris-Cl 0.5 M, pH 6.8

Stock de gel *buffer* 4X, 50 ml
Tris 0.5 M 3.0 g
HCl 4 N a pH 6.8
H₂O desionizada a 50 ml

4. Solución SDS al 10%

(50 ml)
Sodio dodecil sulfato 0.35 M 5.0 g
H₂O desionizada a 50 ml

5. Persulfato de amonio (APS) al 10%

0.44 mM 5.0 g
H₂O desionizada a 1 ml

El APS fresco cruje cuando se agrega el agua, si ésto no ocurre hay que reemplazar el *stock* por otro fresco. Se prepara inmediatamente antes de su uso.

6. Buffer de carga 2X

(0.5 M Tris-Cl, 4% SDS, 20% glicerol, 29% 2-mercaptoetanol, pH 6.8, 10 ml)

Tris-Cl	0.5 M, pH 6.8	0.125 M	2.5 ml
SDS al 10%	0.35 M	0.14 M	4.0 ml
Glicerol		20% v/v	2.0 ml
2-mercaptoetanol		2% v/v	0.2 ml
Ditiotreitol		0.2 mM	0.31 g
Bromofenol azul		0.03mM	0.2 mg
H ₂ O desionizada			10.0 ml

Se dividen en alícuotas de 1.0 ml y se refrigeran a -40°C _ -80°C

Solución de Krebs-Henseleit (mM):

NaCl-----118
KCl-----4.7
KH₂ PO₄-----1.2
MgSO₄, 7H₂O-----1.2
CaCl₂.2H₂O----- 2.5
NaHCO₃-----25
Dextrosa-----11.7
EDTA-----0.026

(Ibarra et al, 2000).

Soluciones de lisis

PREPARAR SOLUCIÓN PARA AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS DEL TEJIDO.

Estabilizador de pH

-Tris HCl 500ml pH 7.4 - 1 ml - 0.01M

Estabilizador de la fuerza iónica.

-NaCl 5M

Inhibidor de proteasas.

-Minicomplet (STOCK 10X) - 100 microL
ROCHE

Preparación 1 pastilla en 1ml de agua M.Q.

Detergentes para lisar las membranas.

-TRITON (Neutro) X100
-SDS Detergente ionico 10%
-Dodecil sulfato de sodio

0.5M tris-Cl, pH 6.8	0.125M	2.5 ml
10% SDS, 0.35M	0.14M	4.0 ml
Glycerol (P.M. 92.09)	20% v/v	2.0 ml
2-mercaptoetanol		

WESTERN BLOT

SEPARADOR SDS		10%		8%	15%	12.5%
	1GEL	2 GELES	4 GELES	1 GEL	1GEL	1 GEL
Agua destilada	3.012 ml	6.025 ml	12.05 ml	3.51 ml	1.76 ml	2.4 ml
Tris pH 8.8	1.875 ml	3.75 ml	7.5 ml	1.9 ml	1.9 ml	1.9 ml
SDS 10%	150 ml	300 ml	0.6 ml	150 ml	150 ml	150 ml
Acrilamida BIS 30:0.8	2.5 ml	5 ml	10 ml	2 ml	3.75 ml	3.13 ml
PSA 10%	75 ml	150 ml	300 ml	75 ml	75 ml	75 ml
TEMED	7.5 ml	15 ml	30 ml	7.5 ml	7.5 ml	7.5 ml

CONCENTRADOR			
	1 GEL	2 GELES	4 GELES
Agua destilada	2.5 ml	4.3 ml	8.55 ml
Tris pH 6.8	950 ml	1.9 ml	3.75 ml
SDS 10%	37.5 ml	75 ml	150 ml
Acrilamida BIS 30:0.8	612.5 ml	1.25 ml	2.5 ml
PSA 10%	37.5 ml	75 ml	150 ml
TEMED	3.75 ml	7.5 ml	15 ml

LOWRY

Solución A: Para 1 litro

	Concentración	Cantidad
Na ₂ CO ₃	2%	20 g
NaOH	0.4%	4 g
Na tartrato de K ó Na	0.2%	2 g

Refrigerar

Nota. - Disolver por separado

Solución B:

CuSO₄ 0.5% 0.5 g /100 ml

Solución C:

50 ml de solución A + 1 ml de solución B (15 ml : 14.7 de A + 300 ml de B) (para 10 ml de sol. Concentrada. 10 ml de sol a + 200 ml de sol. B)

Solución D: Folin (1:2) 50% folin / 50% agua desionizada

Nota.- Preparar solo el volumen necesario.

SOLUCIÓN PATRÓN DE BSA: 0.5 mg / ml.

TUBO	ml de BSA (0.5 mg /ml)	Agua ml	Solución C	Folin (1: 2)
1	0	200	1 ml	0.1 ml
2	25 ml (12.5 mg)	175	1 ml	0.1 ml
3	50 ml (25 mg)	150	1 ml	0.1 ml
4	100 ml (50 mg)	100	1 ml	0.1 ml
5	150 ml (75 mg)	50	1 ml	0.1 ml
6	200 ml (100 mg)	0	1 ml	0.1 ml
			Agitar y reposar 10 min	Agitar y reposar 30 min

10 ml problema + 190 ml H₂O desionizada

LEER A 750 nm

MODIFICACION DEL METODO DE LOWRY
CON REACTIVO DE BIO-RAD

Preparar una curva patrón de albúmina 500µg/ml

Solución patrón de BSA

	µl de BSA*	H ₂ O*
1	0	50
2	6.25	43.75
3	12.5	37.5
4	25	25
5	37.5	12.5
6	50	0

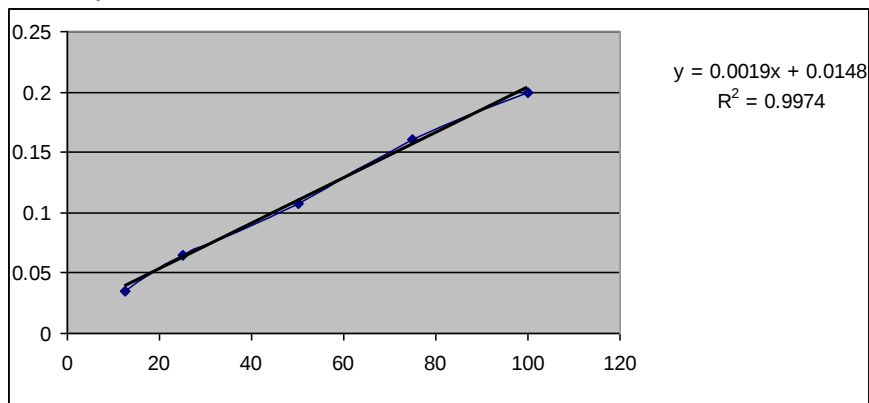
Más 250 μ l de A' y 2000 μ l de B

*Se puede preparar todo por mitad para economizar los reactivos

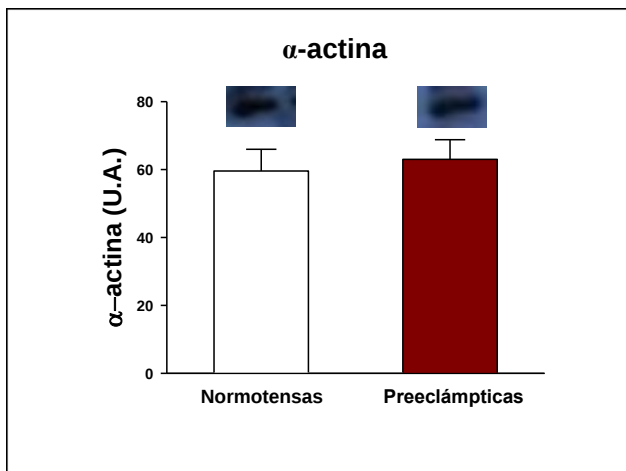
PREPARAR A':

Para 20 μ l de solución S, agregar 1 ml de solución A

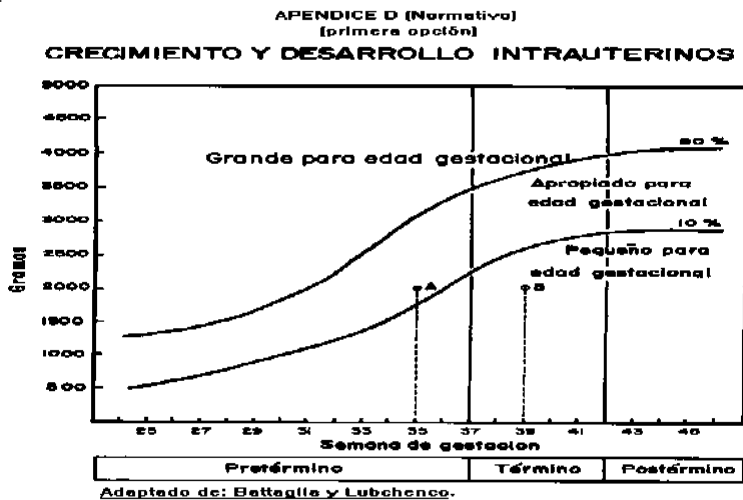
Curva patrón de BSA



α -actina, proteína del citoesqueleto, control interno. No hubo diferencias significativas entre los dos grupos.



NORMA OFICIAL MEXICANA



De acuerdo a la norma oficial mexicana, la gestación puede clasificarse como de pretérmino (< de 37 semanas de gestación), de término (de 37 a 42 SDG) y de posttérmino (> de 42 SDG).

También puede hablarse de un producto de la concepción con un peso apropiado o adecuado para la edad gestacional, cuando su crecimiento y desarrollo, expresado en gramos, se encuentran entre los percentiles 10 y 90; producto grande para la edad gestacional, mayor del percentil 90 y pequeño para la edad gestacional, con un peso menor del percentil 10.

En nuestro estudio, encontramos el peso de los recién nacidos de pacientes preeclámpticas de nuestra muestra adecuado para la edad gestacional, en la mayoría de los casos; solamente un 14% (un solo caso) presentaba peso bajo para la edad gestacional, lo cual es similar a lo que reporta la literatura, ya que se menciona que la mayoría de los hijos de preeclámpticas tienen peso acorde con su edad gestacional. Otros autores, mencionan que sólo una tercera parte de los recién nacidos de este grupo presentan peso inferior al correspondiente para su edad gestacional.